

Efeito da aplicação de bioestimulantes no desenvolvimento e produção de brocolini (*Brassica oleracea* L. var. *Italica* X *Alboglabra*) em condições de stress salino

Emanuel Filipe dos Santos Antunes

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Engenharia Agronómica – Hortofruticultura e Viticultura

Orientadores: Doutora Maria da Glória Calado Inglês Esquível

Doutor Henrique Manuel Filipe Ribeiro

Júri:

Presidente: Doutora Elisabete Tavares Lacerda de Figueiredo Oliveira, Professora Auxiliar do(a) Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Vogais: Doutora Maria da Glória Calado Inglês Esquível, Professora Auxiliar do(a) Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa;

Doutor Joaquim Miguel Rangel da Cunha Costa, Professor Auxiliar do(a) Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

Agradecimentos

À Professora Doutora Maria da Glória Esquível pelas correções, sugestões, e por me ter acompanhado exemplarmente ao longo de todo o trabalho, estando sempre disponível para me ajudar e orientar.

Ao Professor Doutor Henrique Ribeiro pelo acompanhamento e orientação ao longo de todo o ensaio, bem como, pelas sugestões e correções efetuadas.

À ED&F MAN, em especial ao Sr. Hugo Sousa por ter cedido gentilmente os produtos para ensaio, e por todos os seus esclarecimentos e incentivo.

Os meus agradecimentos ao Eng. Rui Barbosa Gomes Coordenador Técnico da Algafarm situada em Patais / SECIL e à Dra. Joana Laranjeira da Silva da Allmicroalgae – Natural Products por terem fornecido a amostra da microalga desidratada *Scenedesmus obliquus*.

Agradeço ao Professor Jorge Marques da Silva da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa por ter permitido a utilização do analisador da eficiência fotossintética PEA (Plant Efficiency Analyzer – Hansatech) e por se mostrar sempre disponível para fornecer todas as informações e esclarecimentos sobre o funcionamento do aparelho.

À Emergosol, nomeadamente aos seus administradores, Exmos. Senhores Hugo Franco, Anne Langan, Emma Rogers e Miguel Langan por darem todas as condições para a realização do ensaio de campo, bem como, pelo apoio, incentivo e flexibilidade demonstrada desde da fase inicial, constituindo uma peça fundamental para a realização deste trabalho.

A todos os meus colegas da Emergosol, pelo apoio, simpatia e amizade com que me receberam desde o primeiro dia, em especial, ao Eng. Paulo Coelho por todos os conhecimentos transmitidos, que foram importantes para a elaboração desta tese e fundamentais para a minha integração profissional.

Aos meus pais e restante família, pelos os valores que me transmitiram, pelo incentivo, e por estarem sempre presentes, nos bons e maus momentos.

Aos meus amigos e colegas do ISA e da ESAS por todos os momentos vividos, desde dos mais instrutivos aos mais lúdicos, tornando-se muito importantes na minha aprendizagem e crescimento pessoal.

À Sandrina pela amizade, carinho, compreensão e incentivo que sempre demonstrou.

A todos os que, apesar de não serem diretamente mencionados, sabem da importância, admiração e respeito que a eles dedico, os meus sinceros agradecimentos.

Resumo

A salinidade é um dos principais stresses que afetam a produtividade das culturas. Embora existam numerosos estudos sobre a salinidade em plantas, os seus efeitos sobre o funcionamento do aparelho fotoquímico não são ainda totalmente compreendidos. A família *Brassicaceae* apresenta um considerável grau de variação na tolerância ao sal e, como são plantas com elevado interesse económico, torna-se importante realizar estudos relacionados com a salinidade para que a sua produtividade não seja afetada. O presente estudo teve como objetivos avaliar a eficiência fotossintética e a produtividade da planta brocolini face a condições de excesso de sais, bem como testar a viabilidade da aplicação de bioestimulantes como ferramenta para reduzir o stress salino nas plantas. Foram delineados dois ensaios experimentais, um em condições controladas no Instituto Superior de Agronomia e, um outro num campo comercial na região Oeste de Portugal. Os dois ensaios contemplaram aplicação de vários produtos estimulantes, a maioria deles disponíveis no mercado, à base de compostos naturais como a glicina betaina, o ácido poliglutâmico, e de algas como a *Ecklonia maxima* e a *Scenedesmus obliquus*.

Realizaram-se diversas medições de parâmetros de crescimento e produtividade, teor de clorofila, índice fotoquímico de refletância (PRI), avaliação do índice de desempenho fotossintético (PI) e da eficiência quântica do fotossistema II (Fv/Fm). Os resultados demonstraram que em condições salinas as plantas apresentam um atraso no seu crescimento, e redução na produtividade dos seus rebentos comestíveis. Por outro lado, as plantas sujeitas a stresse salino apresentam um teor de clorofila ligeiramente superior ao controlo. A razão Fv/Fm não demonstrou diferenças significativas, bem como o PRI. O *Performance Index* é ligeiramente superior nas plantas em meio salino, relativamente às plantas controlo. Nas condições estudadas de salinidade não parece haver uma relação direta entre a *performance* do aparelho fotossintético e a diminuição da biomassa e produtividade do brocolini. De um modo geral, os efeitos dos bioestimulantes ao nível do crescimento e do desempenho fotossintético foram pouco significativos. Contudo pode-se destacar uma influência positiva dos bioestimulantes contendo a macroalga *Ecklonia maxima*, o extrato da microalga *Scenedesmus obliquus*, e o ácido poliglutâmico no aumento da produção de rebentos comestíveis em situação de stresse salino.

Palavras-chave: stress abiótico, salinidade, brocolini, bioestimulantes

Abstract

Salinity is one of the main stresses affecting crop productivity. There are numerous studies about salinity in plants, but its effects on the operation of the photosynthetic machinery are not yet fully understood. *Brassicaceae* family presents a considerable degree of variation in salt tolerance and, due to their high economic interest, it is important to conduct studies related to salinity and productivity. The objectives of the present study were to evaluate the photosynthetic efficiency and productivity of broccolini plant under salt stress, as well as test the viability of the application of biostimulants as a tool to reduce saline stress in plants. Two experimental trials were delineated, one under controlled conditions at Instituto Superior de Agronomia and, another in a commercial field in the western region of Portugal. The assays included the application of several biostimulant products, most of them available on the market, based on natural compounds such as glycine betaine, polyglutamic acid, and algae (*Ecklonia maxima* and *Scenedesmus obliquus*).

Several measurements of growth and productivity parameters, chlorophyll content, photochemical index (PRI), photosynthetic performance index (PI) and quantum efficiency of photosystem II (F_v / F_m) were performed. The results showed that in saline conditions, plants had a delay in their growth, and a reduction in the productivity of their edible shoots. However, plants subject to saline stress have a chlorophyll content slightly higher than control. The F_v / F_m and PRI ratio had no significant differences. Performance Index is slightly higher in saline plants than in control plants. There seems to be no direct relationship between the performance of the photosynthetic apparatus and the decrease in biomass and productivity of broccolini. In general, the effects of biostimulants on growth and photosynthesis performance had little significance. However, the biostimulants with *Ecklonia maxima*, the extract of *Scenedesmus obliquus* and polyglutamic acid had a positive effect on the productivity of the edible shoots under salt stress.

Key words: abiotic stress, salinity, broccolini, biostimulants

Índice

Agradecimentos	I
Resumo	II
Abstract	III
Índice de figuras.....	VI
Índice de quadros.....	VIII
1. Introdução.....	1
2. Revisão bibliográfica	2
2.1. As brássicas	2
2.2. O brocolini	3
2.3. Stresses abióticos nas plantas	4
2.4. Mecanismos de tolerância aos stresses	4
2.5. Stress salino	6
2.6. Resposta das plantas ao stress salino.....	8
2.7. Bioestimulantes.....	10
2.8. Bioestimulantes utilizados neste trabalho.....	11
2.8.1. Glicina betaína	11
2.8.2 Ácido poliglutâmico.....	13
2.8.3. Algas	14
3. Materiais e métodos.....	17
3.1. Material vegetal e localização dos ensaios	17
3.2. Bioestimulantes.....	18
3.3. Ensaio em vasos.....	20
3.3.1. Preparação do ensaio	20
3.3.2. Caracterização do solo.....	20
3.3.3. Salinização e fertilização do solo	21
3.3.4. Delineamento experimental e análise estatística.....	22
3.3.5. Rega	23
3.3.6. Preparação das soluções e aplicação	24
3.3.7. Metodologia das observações e avaliação de parâmetros	26
3.4. Ensaio em campo comercial.....	29
3.4.1. Caracterização do ensaio e gestão da parcela - Local do estudo:.....	29
3.4.2. Delineamento experimental no campo	29
3.4.3. Caracterização do solo e Fertilização.....	30
3.4.4. Preparação das soluções de bioestimulantes	31
3.4.5. Metodologia das observações e avaliação de parâmetros	31

3.4.6.	Avaliação da conservação	31
4.	Resultados experimentais e discussão	32
4.1.	Ensaio em vasos.....	32
4.1.1.	Crescimento das plantas.....	32
4.1.2.	Número de folhas na planta	32
4.1.3.	Altura das plantas e diâmetro do caule	35
4.1.4.	Biomassa	36
4.1.5.	Produção do brocolini no ensaio em vasos	38
4.1.6.	Desenvolvimento radicular	44
4.1.7.	Parâmetros fisiológicos, fotossintéticos e estado da planta	45
4.2.	Ensaio em campo comercial.....	52
4.2.1.	Produção do brocolini	52
4.2.2.	Conservação pós-colheita	53
5.	Conclusões.....	55
6.	Referências bibliográficas	57
Anexo I	- Ficha técnica do bioestimulante Vegetal B45 (Glicina betaína)	72
Anexo II	- Ficha técnica do bioestimulante Gamma PGA (ácido poliglutâmico)	74
Anexo III	- Ficha técnica do bioestimulante Algaman B (Macroalga <i>Ecklonia maxima</i>).....	76
Anexo IV	– Rótulo da microalga <i>Scenedesmus obliquus</i>.	78
Anexo V	– Localização dos ensaios	79
Anexo VI	– Boletim de análise ao solo do ensaio em campo comercial.	80
Anexo VII	- Boletim de análise ao solo do ensaio em vasos.	82
Anexo VIII	– Esquematização da disposição das modalidades no ensaio em campo comercial.....	84
Anexo IX	– Outputs estatísticos da análise de variância (ANOVA) efetuada no programa Statistix 9.	85

Índice de figuras

Figura 1 - As fases de resposta das plantas ao stress salino: fase osmótica e fase iónica. ..	7
Figura 2 - Mecanismos de perceção e indução da resposta da planta face ao stress.....	8
Figura 3 - Vista aérea da parcela em São Pedro da Cadeira.	17
Figura 4 - Esquematização do posicionamento e distribuição dos vasos.....	22
Figura 5 - Disposição dos vasos e plantas.....	23
Figura 6 - Pesagem dos vasos a fim de regar a quantidade adequada.	24
Figura 7 - Frações com a suspensão de microalga <i>Scenedesmus obliquus</i>	25
Figura 8 – Homogeneização da solução de microalga.....	25
Figura 9 - Aplicação da solução a uma planta.	26
Figura 10 - Medição com o aparelho SPAD 502.	27
Figura 11 - Medição com o aparelho PlantPen PRI 200.	27
Figura 12 - Colheita dos rebentos de broccolinis.	28
Figura 13 - Ensaio em campo comercial na zona de Torres Vedras.	30
Figura 14 - Comparação entre as plantas em solo salino e não salino, em diversas semanas do ciclo das plantas.....	34
Figura 15 - Valores de diâmetro do caule medido ao nível do solo, registados a meio e no final do ciclo cultural.	35
Figura 16 - Produção média por planta de broccolini nas diferentes modalidades em estudo.	39
Figura 17 - Evolução da produção média por planta de broccolini nas diferentes modalidades em estudo.	40
Figura 18 - Output estatístico correspondente à análise de variância para o peso acumulado nas várias colheitas.....	41
Figura 19 - Comparação entre as plantas de broccolini sem stress e com stress salino.....	43
Figura 20 - Aglomerados radiculares de uma amostra de plantas cultivadas em solo sem a adição de NaCl e com a adição de NaCl.	44
Figura 21 - Valores da leitura SPAD/clorofila nas folhas mais jovens do broccolini, registado nas primeiras semanas do ciclo cultural..	45
Figura 22 - Valores médios da leitura SPAD/clorofila nas folhas expandidas registados ao longo do ciclo cultural.....	46
Figura 23 - Valores médios da interação entre salinidade e os bioestimulantes ao nível dos valores de leitura SPAD/Clorofila em folhas velhas de broccolinis.	47
Figura 24 - Valores médios do índice de refletância fotoquímica (PRI) nas folhas expandidas, registado ao longo do ciclo cultural com o aparelho PlantPen PRI 200 (PSI).	48

Figura 25 - Valores médios da eficiência quântica máxima do PSII (Fv/Fm) medida em folhas de brocolini expandidas sujeitas a diferentes tratamentos.	49
Figura 26 - Índice de desempenho fotossintético dos brocolinis sujeitos a diversos tratamentos com bioestimulantes, na 8ª e 13ª semanas do ciclo cultural.	50
Figura 27 - Evolução da produção do brocolini ensaiado em campo comercial, nos diferentes tratamentos ao longo das várias colheitas.....	52
Figura 28 - Fotografias dos rebentos de brocolini ao longo do processo de conservação..	54

Índice de quadros

Quadro 1 - Composição dos produtos comerciais utilizados no estudo	18
Quadro 2 - Características dos produtos comerciais utilizados no estudo.	19
Quadro 3 - Características do solo utilizado no ensaio.	20
Quadro 4 - Quantidades determinadas a aplicar de fundo por planta.	21
Quadro 5 - Fertilizantes aplicados de fundo por planta.	21
Quadro 6 - Caracterização das modalidades.....	22
Quadro 7 - Parametrização das aplicações de soluções bioestimulantes.	26
Quadro 8 - Características do solo utilizado no ensaio de campo.....	30
Quadro 9 - Fertilizantes aplicados no ensaio de campo.....	30
Quadro 10 - Parametrização das aplicações das soluções bioestimulantes.	31
Quadro 11 - Número de folhas médio na planta em função da semana e da salinidade.....	33
Quadro 12 - Parâmetros de crescimento do brocolini medidos no final do ensaio..	35
Quadro 13 - Valores médios de massa fresca, massa seca, percentagem de matéria seca e conteúdo em água dos tecidos nas plantas de brocolini.	36
Quadro 14 - Valores médios de massa fresca, massa seca, percentagem de matéria seca e conteúdo em água dos tecidos nas plantas de brocolini sujeitas a diferentes tratamentos com bioestimulantes..	37
Quadro 15 - Valores médios da razão massa fresca/massa seca para os diferentes tratamentos em estudo.....	38
Quadro 16 - Valores médios da produção do brocolini em cada colheita e somatório total, em meio salino e não salino.	38
Quadro 17 - Valores médios do peso dos rebentos de brocolini acumulado em cada colheita, nos diferentes tratamentos em estudo.....	41
Quadro 18 - Somatório das massas vegetais quantificadas para as duas séries (não salina e salina) e respetivo índice de colheita.....	42
Quadro 19 - Somatório das massas vegetais quantificadas para os diferentes tratamentos e respetivo índice de colheita..	43
Quadro 20 - Valores médios da leitura SPAD/Clorofila nas folhas mais velhas do brocolini, nas primeiras duas semanas do ciclo cultural.	46
Quadro 21 - Valores médios de pH e condutividade elétrica para cada uma das séries de salinidade.	51
Quadro 22 - Valores médios da massa de rebentos por planta, em gramas, no total das colheitas dos brocolinis no ensaio de campo comercial.....	53
Quadro 23 - Percentagem de redução de peso do dia 0 para o dia 60, nas diferentes modalidades.....	53

Lista de abreviaturas

ABA.....	Ácido abscísico
APX.....	Ascorbato peroxidase
Car.....	Carotenoides
CAT.....	Catalase
CE.....	Condutividade elétrica
CTC.....	Capacidade de troca catiónica
Fv.....	Fluorescência variável
Fm.....	Fluorescência máxima
GB.....	Glicina betaína
GSH.....	Glutathione
HSPs.....	Proteínas de choque térmico (<i>Heat-shock proteins</i>)
LEA.....	Proteínas <i>Late embryogenesis abundant</i>
M.O.....	Matéria orgânica
OJIP.....	Curva rápida de indução de fluorescência da clorofila
PGA.....	Ácido poliglutâmico (<i>Polyglutamic acid</i>)
PI.....	Índice de desempenho (<i>Performance Index</i>)
POX.....	Guaiacol peroxidase
PRI.....	Índice de refletância fotoquímica (<i>Photochemical Reflectance Index</i>)
Pro.....	Prolina
PSII.....	Fotossistema II
RC.....	Centros de reação (<i>Reaction centers</i>)
ROS.....	<i>Reactive oxygen species</i>
r.p.m.....	Rotações por minuto

1. Introdução

O sector agrícola tem procurado satisfazer as necessidades e a procura dos novos consumidores, disponibilizando vegetais variados, cada vez mais atrativos organoleticamente. Um exemplo destes produtos é o broccolini (*Brassica oleracea* L. *Italica* X *Alboglabra*). Este vegetal, semelhante ao brócolo, mas com talos mais finos e longos, tem um sabor mais doce. Trata-se de uma cultura ainda pouco conhecida, mas é muito interessante do ponto de vista agronómico e comercial.

Com o acentuado aumento da procura e consumo do broccolini, torna-se importante estudar o seu comportamento agronómico, bem como analisar a sua reação aos solos salinos, que são muito comuns nas extensas zonas litorais do nosso País. As espécies da família *Brassicaceae* apresentam variações consideráveis na tolerância ao sal e pouco se sabe sobre o efeito da salinidade nesta nova cultura.

A salinidade é um dos principais fatores abióticos que alteram o desenvolvimento e produtividade das culturas, tendo ainda influencia na indução de outros stresses, como por exemplo, o stress hídrico. Por isso, torna-se fundamental encontrar e testar soluções para contrariar estes fatores que afetam a produção das plantas e que tendem a ser cada vez mais frequentes, dada a situação de alterações climáticas que vivemos e que se perspetivam ser cada vez mais acentuadas no futuro.

Em alternativa aos fertilizantes convencionais, têm surgido no mercado, produtos de origem natural conhecidos como bioestimulantes. Muitos deles são subprodutos da indústria agroalimentar, resultando do aproveitamento de matérias de origem vegetal, e por isso são ricos em diversos compostos, entre os quais, alguns responsáveis por estimular as plantas quando estão em condições ambientais adversas.

Deste modo, um dos objetivos foi avaliar o efeito da aplicação de quatro bioestimulantes em plantas de broccolini induzidas em stress salino e produzidas em condições controladas, e ainda, o efeito provocado nas mesmas plantas, mas em condições de produção comercial, existindo assim um segundo ensaio realizado numa empresa de produção agrícola na região Oeste de Portugal. Foram avaliados diversos parâmetros relacionados com a fotossíntese recorrendo a técnicas óticas não destrutivas, e uma quantificação da produtividade ao longo do ciclo da cultura, bem como a análise do potencial conservativo dos broccolinis em pós-colheita quando sujeitos à aplicação de bioestimulantes no campo.



2. Revisão bibliográfica

2.1. As brássicas

A família das *Brassicaceae* inclui algumas das culturas mais importantes economicamente a nível mundial, comercializadas e consumidas na forma de folhas, raízes, óleos e temperos (Maggioni, 2015).

Da família fazem parte 321 géneros e 3660 espécies (Al-Shehbaz, 2012). Dentro do género *Brassica* existem várias espécies conhecidas, algumas delas domesticadas, como é o caso da *B. carinata*, *B. juncea*, *B. oleracea*, *B. rapa* e a *B. napus*. Entre as espécies surgem variações morfológicas (Hall *et al.*, 2011) e adaptações fisiológicas, como por exemplo, resistências a pragas e doenças, a metais pesados, ou a fatores abióticos como a seca e a salinidade (Fahey *et al.*, 2001).

As Brássicas fazem parte da dieta das populações em muitas regiões do globo, com destaque para as variedades da espécie *Brassica oleracea* L., que inclui os brócolos, couves-de-bruxelas, repolhos, couve-flor, couve-rábano e folhosas (OCDE, 2012). São produzidas em todo o mundo, com exceção de algumas zonas tropicais (Maggioni, 2015). A FAOSTAT (2018) estima que em 2016 a produção de brássicas foi superior a 96 milhões de toneladas, numa área de 3,8 milhões de hectares (não contabilizando as oleaginosas), sendo a Ásia o continente com mais produção (entre 75% e 80% da produção mundial). Portugal representa apenas 0,2% da produção mundial, com uma área de 9 815 hectares, produzindo 233 078 toneladas de *brassicáceas*.

Estes vegetais são fonte de fibras, vitaminas A, C e E (Hedges & Lister, 2006), proteínas (Dekker *et al.*, 2000), açúcares solúveis (Pedroche *et al.*, 2004), minerais e polifenóis (Heimler *et al.*, 2005). Para além disso, são ricos em glucosinolatos (Fowke *et al.*, 2003) e outros antioxidantes (Hanf & Gonder, 2005), que são responsáveis pela redução do risco de alguns tipos de doenças cancerígenas em humanos (Wang *et al.*, 2004a; Mithen *et al.*, 2003). Os glucosinolatos são responsáveis pelo intenso sabor de alguns vegetais e a sua capacidade anticancerígena não é direta. Os efeitos benéficos resultam da hidrólise destes compostos em outros como o isotiocianato, através da enzima tioglucosidase ou mais tarde através da flora intestinal (Hedges & Lister, 2006).

2.2. O brocolini

O brocolini (*Brassica oleracea* L. *Italica* X *Alboglabra*) é um vegetal verde, semelhante ao brócolo, mas com talos mais finos e longos, e um sabor mais doce. É proveniente do cruzamento entre o brócolo e a couve chinesa, e apresenta pequenos floretes (Li *et al.*, 2015; Xu *et al.*, 2015; Wang & Zhang, 2012; Martínez-Hernández *et al.*, 2011). Cada rebento (caule e florete) de brocolini tem em média 15 a 18 centímetros de comprimento e 1 centímetro de diâmetro (Martínez-Hernández *et al.*, 2011).

É também conhecido como asparation ou brócolo baby (Yang *et al.*, 2011), ou ainda através de marcas comerciais, como Bimi®, Tenderstem®, Vellaverde® (Martínez-Hernández *et al.*, 2013). Foi desenvolvido pela primeira vez em 1993 no Japão. Em 1994 foi iniciada a sua produção comercial no México e em 1996 chegou aos Estados Unidos, mas só ganhou a designação de brocolini em 1998 (WSU, s.d.).

É uma hortícola nutricionalmente semelhante ao brócolo (Wang & Zhang, 2012), rica em vitaminas A e C, ácidos fólicos, flavonoides, glucosinolatos (Xu *et al.*, 2015) e antioxidantes (Akins *et al.*, 2016). Devido aos seus constituintes, é considerado um vegetal quimiopreventivo, ou seja, apresenta um elevado potencial para ajudar na prevenção e tratamento de cancro em humanos (Wang & Zhang, 2012; Paško *et al.*, 2018).

O maior consumo situa-se nos países do Norte da Europa, Estados Unidos, Brasil, Austrália e Reino Unido (Martínez-Hernández *et al.*, 2013). A sua produção e consumo têm vindo a aumentar e a cultura está a difundir-se cada vez mais em todo o mundo. Em 2011 as vendas de uma das marcas registadas de brocolini aumentaram quase 30% face ao anterior ano de 2010 (Fresh Plaza, 2012). O produto pode ser consumido em diversas formas de preparação, sendo que geralmente são consumidos a totalidade do caule e do florete.

Nas condições climáticas de Portugal, o brocolini é produzido durante todo o ano. As exigências agronómicas são muito semelhantes ao brócolo convencional (Bimi, s.d.). Uma das diferenças, prende-se na periodicidade de colheita. Enquanto no brócolo a colheita é realizada 1 a 2 vezes por campanha, no caso do brocolini a colheita é efetuada semanalmente a partir da oitava ou nona semana do ciclo e pode durar mais de 2 meses, dependendo da época do ano e das condições de desenvolvimento da planta. Para além disso, ao contrário do que se faz por norma na cultura do brócolo, no brocolini não se colhem as inflorescências inteiras, dado que apenas interessa colher os rebentos ou floretes separados. Por esta razão, é necessário que a inflorescência descompacte e se comece a dividir em vários rebentos. Deste modo, ocorre uma primeira colheita aos floretes derivados da inflorescência principal, enquanto que os restantes se formam adventiciamente no caule principal da planta.

É um produto com reduzido tempo de conservação, por isso, torna-se importante que seja conservado em frio logo após a colheita, para que o seu período útil seja o mais longo possível, sendo comercializado essencialmente em fresco.

2.3. Stresses abióticos nas plantas

O stress é usualmente definido como um fator externo que provoca uma influência negativa na planta. Na maioria dos casos, a intensidade do stress é quantificada em relação ao estado de sobrevivência da planta, à produtividade, crescimento (acumulação de biomassa), metabolismos de assimilação de CO₂, estando tudo isto relacionado com o desenvolvimento geral da planta (Taiz & Zeiger, 2010). Apesar da redução do crescimento permitir o incremento da taxa de sobrevivência da planta, em situações de stress moderado em que a vitalidade da planta não está em perigo, o fraco desenvolvimento pode ser considerado como uma consequência negativa e que afeta desfavoravelmente a produção (Skirycz & Inze, 2010).

O conceito de stress é relativo, visto que determinada situação ambiental pode ser prejudicial para umas espécies e não o ser para outras (Azcón-Bieto & Talón, 2000). Contudo, na maioria dos casos, a exposição das plantas a stresses prolongados como a seca, temperaturas extremas, carência de nutrientes ou salinidade, resultam no enfraquecimento das defesas e no aumento da suscetibilidade a stresses bióticos (Anderson *et al.*, 2004; Sandermann, 2004; Zhu *et al.*, 2010).

Em geral, estes stresses têm impacto num grande número de componentes celulares e metabolismos, mas a magnitude dos danos causados dependem da proporção, intensidade e duração do stress, bem como da capacidade que a planta tem para o tolerar (Batista-Santos, 2010). As plantas apresentam um estado fisiológico característico e ótimo para as condições ambientais a que estão expostas. Se forem sujeitas a situações adversas ou desadequadas, demonstram características bioquímicas adaptadas às referidas condições.

2.4. Mecanismos de tolerância aos stresses

Conhecer os mecanismos responsáveis pela redução do crescimento das plantas sob stress, constitui um requisito importante para fomentar a produtividade das culturas (Skirycz & Inze, 2010). Isto leva-nos ao conceito reação ou resposta, e é definido como qualquer alteração, estrutural ou funcional, que ocorre nas plantas como consequência de um stress (Azcón-Bieto & Talón, 2000).

As reações da planta ao stress são complexas. Há uma alteração gradual dos metabolismos em resposta ao stress, sendo que uma das formas de resposta, passa pela baixa regulação inicial dos metabolismos energéticos e síntese de proteínas. Isto permite uma conservação de energia, que funciona como mecanismo de defesa, alterando o crescimento das plantas (Cramer *et al.*, 2011), mas estas recuperam e adaptam-se quando as condições estabilizam (Skirycz & Inze, 2010). O processo constitui um mecanismo de defesa face ao stress, pelo que, as plantas que não possuam esse mecanismo apresentam danos irreversíveis e acabam por morrer. O mesmo acontece quando o stress é muito intenso e supera a capacidade de resposta da planta (Tadeo, 2000).

Segundo Lichtenthaler (1996), a resposta das plantas ao stress pode dividir-se em quatro fases. A primeira corresponde à fase de reação ou alarme, em que planta reduz os seus metabolismos fisiológicos e o seu vigor. A segunda é a fase de resistência em que a planta se adapta ao stress, ativa mecanismos defensivos e de reparação de células danificadas. Se posteriormente, o stress se mantiver, ocorre a terceira fase em que a planta esgota a sua capacidade de resistência e acabar por morrer. Caso o stress seja pouco prolongado, a planta tem capacidade de regenerar as suas funções fisiológicas e atingir um estado fisiológico ótimo para as condições presentes. Este último processo corresponde à fase quatro, chamada fase de regeneração.

A fotossíntese é um dos processos mais importantes no crescimento e produção vegetal. Por exemplo, em caso de stress hídrico, a condutância estomática diminui (Filippou *et al.*, 2013), provocando uma diminuição da fixação do CO₂ e, portanto, da taxa fotossintética (El-Hendawy *et al.*, 2005). A manutenção de uma taxa fotossintética elevada é um ponto chave para garantir produções e crescimentos aceitáveis em condições ambientais desfavoráveis (Tian *et al.*, 2016).

A reação da planta a uma combinação de stresses é ainda mais complexa do que em situações de problemas abióticos individuais, sendo a resposta controlada por um conjunto de sinais e processos que podem interagir entre si e inibir-se uns aos outros. Cada stress ou conjunto de stresses, tem uma reação específica (Suzuki *et al.*, 2014). Os metabolismos e sinais estão relacionados com alterações dos fatores de transcrição, da fotossíntese, dos mecanismos antioxidantes, bem como da síntese de hormonas (Rizhsky *et al.*, 2004; Atkinson *et al.*, 2013; Prasch & Sonnewald, 2013; Rasmussen *et al.*, 2013). Porém, a maior parte dos mecanismos associados à tolerância e resposta das plantas face aos stresses, ainda está por conhecer (Suzuki *et al.*, 2014).

2.5. Stress salino

Os solos salinos são muito comuns nas zonas litorais, e podem ser prejudiciais para a produção agrícola. Estima-se que aproximadamente 20% da área cultivada e 33% da área irrigada a nível mundial são afetadas por salinidade elevada (Shrivastava & Kumar, 2015). O principal sal que surge nos ambientes salinos é o cloreto de sódio (Viegas *et al.*, 2001).

O fenómeno associado ao excesso de sais pode ter diversas origens, tais como, a proximidade do mar, elevada evaporação, declives acentuados, rega com água salgada, baixa pluviosidade ou devido a técnicas agrícolas desadequadas (Ashraf & Fooland, 2007). Para além disso, Munns & Tester (2008) referem que a água da chuva contém 6-50 mg/kg de NaCl que poderá contribuir para a salinização dos solos, sendo que esta concentração decresce à medida que aumenta a distância das zonas costeiras.

A salinidade, a par com o défice hídrico, são os stresses mais importantes das plantas a nível mundial (Filippou *et al.*, 2013). Estes dois stresses estão muito correlacionados, visto que a salinidade provoca a redução na assimilação de nutrientes (Zhao *et al.*, 2007) e na absorção de água (Munns, 2002; Munns & Tester, 2008), o que leva à diminuição da sua disponibilidade nas células (Verslues *et al.*, 2006), culminando na alteração dos metabolismos e numa redução no crescimento da planta, associado à acumulação de solutos, alterações no volume celular e forma das membranas, perda de turgidez, bem como a desnaturação de proteínas (Bray, 1997). A água é um fator muito limitante para o crescimento e desenvolvimento das plantas (Azcón-Bieto & Talón, 2000). É o componente maioritário dos tecidos vegetais, sendo que chega a constituir 90% do peso fresco em espécies herbáceas e mais de 50% em lenhosas (Tadeo 2000; Azcón-Bieto & Talón, 2000). Quando sujeitas a períodos em que não conseguem absorver água, tendem a apresentar murchidão e folhas cloróticas como sintoma, podendo também surgir necroses em períodos mais prolongados de défice de água (Filippou *et al.*, 2013). Aguirrezabal *et al.*, (2006) demonstraram em *Arabidopsis* que a existência de défice de água afeta a área foliar, através da redução do número e tamanho das células. Além da redução da área foliar, existe também uma limitação do número de folhas, associada a uma menor produção de novas folhas e à ocorrência de senescência (Rodrigues, 2005).

O crescimento das plantas é afetado pelo stress salino em duas fases (Figura 1): a rápida ou osmótica em que ocorre a inibição do desenvolvimento de folhas jovens, e a fase lenta ou iónica em que há um aumento da senescência das folhas mais velhas (Munns & Tester, 2008). O fator osmótico está relacionado com a dificuldade que a planta tem em contrariar os acentuados valores negativos do potencial hídrico do solo salino, e desta forma há dificuldade na absorção de água. Por sua vez, o fator iónico prende-se com a acumulação

elevada nos vacúolos de iões. A acumulação pode chegar a níveis tóxicos nas folhas, como por exemplo o ião Na^+ , que compete com a entrada do K^+ um elemento essencial para a planta (Azcón-Bieto & Talón, 2000). Acumulações elevadas de iões reduzem a taxa fotossintética e provocam, por vezes, perda de pigmentos, como a clorofila e carotenoides (Allakhverdiev *et al.*, 2000; Tian *et al.*, 2016) e ainda uma diminuição na assimilação de azoto (Flores *et al.*, 2004). Consequentemente ocorre uma diminuição da área foliar e na quantidade de matéria seca produzida (Bacarin *et al.*, 2011). A parte aérea das plantas é mais sensível à salinidade do que as raízes, mas ainda não há uma explicação clara para esse facto (Munns & Tester, 2008).

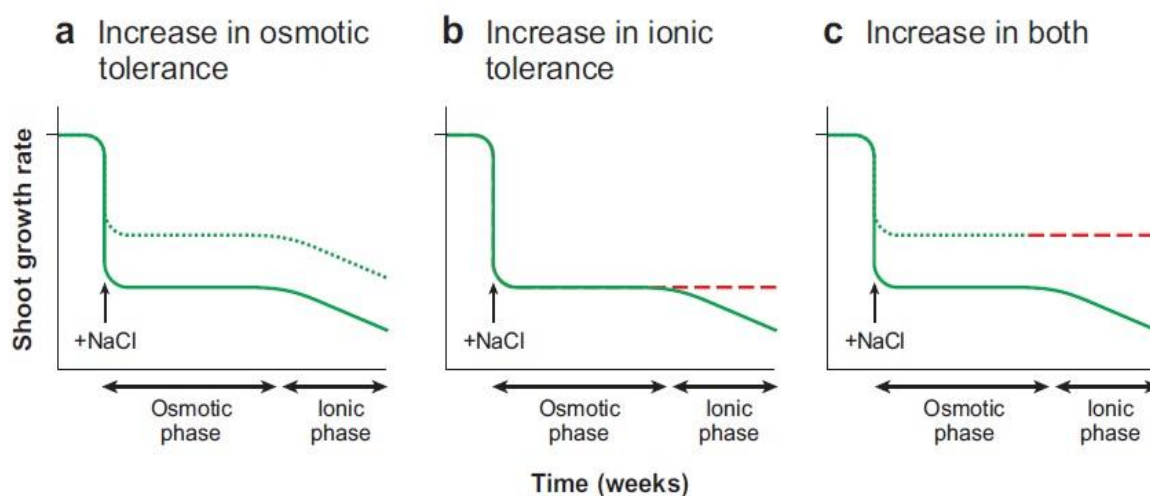


Figura 1 - As fases de resposta das plantas ao stress salino: fase osmótica e fase iónica. A linha verde a cheio representa a variação da taxa de crescimento da planta após adição do sal. [a] A linha tracejada verde representa a resposta hipotética da planta, se houver tolerância à componente osmótica da salinidade. [b] A linha tracejada vermelha representa a resposta da planta se existir tolerância à componente iónica do stress salino. [c] A linha verde e vermelha tracejada representa a resposta da planta se existir tolerância às duas componentes do stress salino. [Fonte: Munns & Tester, 2008].

Existem três formas distintas de as plantas tolerarem a salinidade. A primeira é a tolerância osmótica, em que há um fecho dos estomas e uma redução da expansão das raízes e folhas jovens. A segunda forma é a exclusão de Na^+ ou Cl^- através das raízes de forma a que estes iões não acumulem e causem toxicidade nas folhas. A terceira forma é a tolerância da planta para acumular Na^+ ou Cl^- nos vacúolos das células dos tecidos foliares, mas que com o tempo, leva à ocorrência de toxicidade devido a elevadas concentrações destes iões nas folhas mais velhas. (Munns & Tester, 2008).

É certo que a nutrição tem um papel preponderante na defesa da planta contra fatores adversos, pelo que uma planta bem nutrida tem maior capacidade de resistir a condições desfavoráveis. Especificamente em condições de stress salino, o boro tem uma função importante na resistência das plantas ao excesso de sais, tal como demonstraram del Carmen

Martinez-Ballesta *et al.* (2008) e del Carmen Rodríguez Hernández *et al.* (2013). O antagonismo entre o boro e o sal provoca uma menor acumulação de Na^+ nas folhas e consequente decréscimo da toxicidade. Por outro lado, a presença de sal pode levar à redução da acumulação de boro nas folhas em culturas como o brócolo, tomate, pinheiro e vinha (del Carmen Martinez-Ballesta *et al.*, 2008).

2.6. Resposta das plantas ao stress salino

Em condições de salinidade, as plantas apresentam diversos mecanismos que as ajudam a responder ao stress. Elevadas concentrações de sal no solo estimulam a formação de ácido abscísico (ABA) nas raízes, que é de seguida translocado pelo xilema até chegar às folhas (Davies *et al.*, 2005; Taiz & Zeiger, 2010), emitindo sinais do stress (Munns & Tester, 2008) de forma a promover a redução do crescimento e fecho dos estomas diminuindo condutância estomática (Davies *et al.*, 2005). O processo de abertura e fecho dos estomas está associado à ação coordenada do mecanismo que controla a turgescência das células-guarda e da regulação de hormonas (Rodrigues, 2005). O ABA é produzido como resposta a stresses (Figura 2) e induz o funcionamento de um conjunto de processos que resultam na tolerância ao fator desfavorável (Atkinson *et al.*, 2013), atuando como um regulador global da resposta da planta (Anderson *et al.*, 2004).

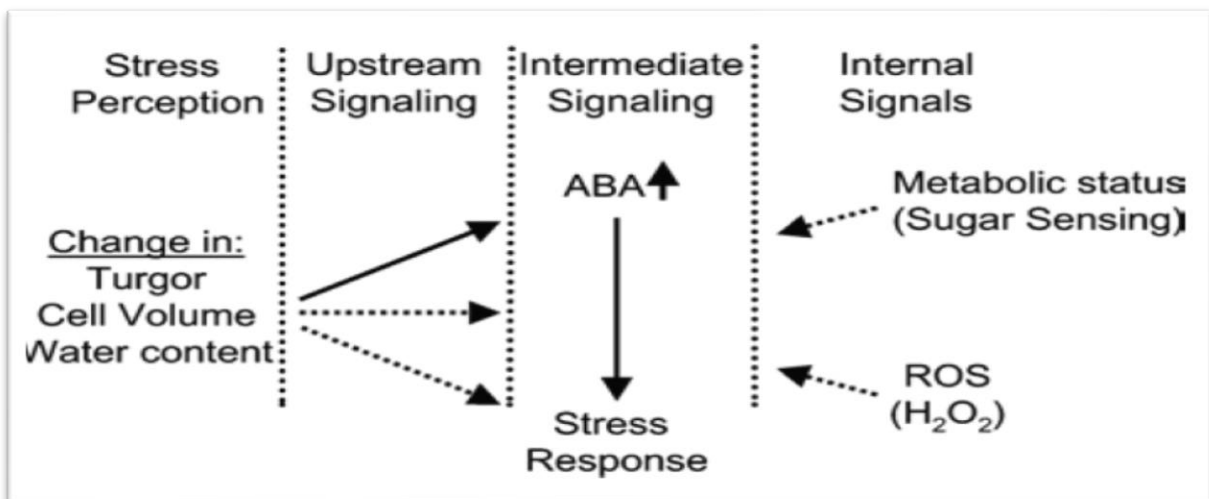


Figura 2 - Mecanismos de percepção e indução da resposta da planta face ao stress. A sinalização e resposta ao stress pode ser feita através do ABA (linha a cheio) ou através de mecanismos independentes do ABA (linha a tracejado). [Fonte: Verslues & Zhu, 2005].

O ABA pode ainda promover a síntese de proteínas LEA (Taiz & Zeiger, 2010). As proteínas LEA (*Late embryogenesis abundant*) são um grupo de polipéptidos presente num grande número de espécies vegetais e é conhecida a sua influência na proteção das plantas face a vários stresses (Gao & Lan, 2016). Têm propriedades semelhantes às chaperonas e ajudam a estabilizar as estruturas das proteínas quando existem grandes quantidades de sal nas células (Munns, 2005). Um estudo revelou que plantas que produzem estas proteínas, apresentam taxas de crescimento normais mesmo em condições de stress hídrico e salino, devido ao atraso dos sintomas causados pelas condições adversas (Park *et al.*, 2005). Existem ainda outras proteínas importantes, como as de choque térmico ou *Heat-shock proteins* (HSPs), que são chaperonas responsáveis pelo desdobramento, montagem, estabilização, translocação e degradação de proteínas em vários processos celulares, quando existem condições de stress ambiental (Wang *et al.*, 2004b).

Outro mecanismo de tolerância a fatores ambientais desfavoráveis é a acumulação de solutos compatíveis (Ashraf & Fooland, 2007). Estes solutos são pequenas moléculas, não tóxicas, capazes de estabilizar proteínas e membranas quando afetadas por solutos prejudiciais, como acontece em condições de stress salino (Yancey, 2005). Exemplo desses solutos compatíveis são a prolina, a glicina betaína, polióis como o manitol e o sarbitol, e açúcares como a sacarose, rafinose (Munns, 2005) e a trealose (Crowe, 2007). Os açúcares e os polióis atuam como reguladores osmóticos, facilitando a retenção de água no citoplasma e permitindo o sequestro de sódio no vacúolo. Estes osmólitos protegem e estabilizam as estruturas células ao interagir com membranas, proteínas complexas, ou enzimas. Para além disso, os açúcares também atuam no armazenamento de carbono (Parida & Das, 2005).

A prolina é um dos solutos compatíveis mais comuns, e tem efeito na resposta à salinidade e déficit hídrico, ao promover a absorção de água (Ashraf & Fooland, 2007). Segundo Szabados e Savouré (2010), a acumulação de prolina está associada a uma grande variedade de stresses, e constitui um dos maiores antioxidantes não-enzimáticos. Este aminoácido surge em elevada quantidade nas plantas que se desenvolvem num meio com abundante quantidade de sais (Mittal *et al.*, 2012), mas a sua concentração é superior em plantas sujeitas a condições de seca (Filippou *et al.*, 2013). A prolina é um elemento importante na proteção das plantas, atuando na biossíntese de poliaminas (Suzuki *et al.*, 2014), e tem influência na indução da expressão de genes que atuam na resposta das plantas a stresses, como a salinidade (Chinnusamy *et al.*, 2005).

Por sua vez, as poliaminas regulam o desenvolvimento vegetal, atuando na divisão e diferenciação celular (Ashraf & Harris, 2004). Em situação de stress, a concentração de poliaminas pode aumentar ou diminuir em função do órgão, da espécie da planta, intensidade

do stress e duração da exposição (Kasinathan & Wingler, 2004). Este composto tem uma função muito importante na tolerância das plantas aos stresses, sendo que a síntese é duas a três vezes superior nas plantas mais tolerantes, comparativamente a plantas sensíveis (Kasukabe *et al.*, 2004). A função protetora das poliaminas é sobretudo devido à sua natureza catiónica, através da ligação a proteínas e lípidos, podendo estabilizar as estruturas celulares (Kasinathan & Wingler, 2004).

A salinidade pode também dar lugar ao stress oxidativo, ao provocar um aumento da acumulação de ROS (*reactive oxygen species*) para níveis tóxicos (Banu *et al.*, 2009), podendo ocorrer em qualquer situação de stress ambiental que induza um decréscimo na fotossíntese (Munns, 2005). De todos os ROS produzidos nas plantas, o superóxido (O_2^-) e o peróxido de hidrogénio (H_2O_2) são os mais importantes devido à sua elevada toxicidade e permeabilidade através das membranas (Ortuño, 2014). Porém, as plantas possuem antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos para proteger as células dos danos causados pelas ROS (Kibria *et al.*, 2017). De entre as enzimas antioxidantes destacam-se a catalase (CAT), guaiacol peroxidase (POX) e as ascorbato peroxidase (APX) (Hasanuzzaman *et al.*, 2014). No grupo dos antioxidantes não enzimáticos encontram-se o ácido ascórbico (vitamina C), a glutathione (GSH), a prolina (Pro), o tocoferol (vitamina E), os carotenoides (Car), e os flavonoides (Gill & Tuteja, 2010).

Os danos causados na planta dependem do seu tipo de resistência e do tecido afetado pelo stress (Filippou *et al.*, 2013). Apesar de as plantas terem a capacidade de tolerar e ultrapassar situações de stress através dos mecanismos descritos anteriormente, é fundamental encontrar soluções economicamente viáveis que auxiliem as culturas a contornar mais facilmente o efeito negativo dos efeitos ambientais, e deste modo evitar a redução da produtividade. Uma das soluções passa por ministrar de forma exógena, substâncias hormonais ou solutos compatíveis, produzidos em pequena quantidade pelas plantas, em situação de stress. O conceito consiste em aumentar a concentração de metabolitos específicas no interior da planta, de forma a que mais facilmente consigam suportar a situação desfavorável e prosseguir o seu crescimento normal.

2.7. Bioestimulantes

Com o rápido crescimento populacional, o setor agrícola enfrenta uma grande necessidade de aumentar a sustentabilidade da produção e o uso de recursos naturais, principalmente devido a um aumento da escassez de água e de terra arável (Lyson, 2002; Tilman *et al.*, 2002). Durante anos, a utilização de produtos inorgânicos/sintéticos era considerada uma forma eficiente para ultrapassar estas barreiras produtivas (Lyson, 2002;

Sharma *et al.*, 2014). Contudo, os produtos sintéticos apresentam um impacto negativo na natureza, pelo que a utilização de estimulantes naturais está a tornar-se cada vez mais popular (Sharma *et al.*, 2014).

Um bioestimulante é definido como um material orgânico e sintético, que quando aplicado em pequenas quantidades, tem a capacidade de promover o crescimento e desenvolvimento das plantas, sendo a resposta não atribuível à aplicação tradicional de nutrientes. Estes produtos incluem diversas formulações de compostos e substâncias como microrganismos, micronutrientes, enzimas, reguladores de crescimento, extratos de algas, que ao serem aplicados às plantas ou ao solo, melhoram os processos fisiológicos das culturas (Sharma *et al.*, 2014).

Resultados de diferentes estudos indicam que estes compostos naturais têm uma influência positiva ao nível da produtividade e qualidade das plantas, em situações de stresses bióticos e abióticos (Craigie, 2011; Sharma *et al.*, 2014; Povero *et al.*, 2016). Para além disso, alguns autores demonstraram que pequenas concentrações de alguns bioestimulantes têm um efeito positivo na produção, no aumento da taxa de crescimento, bem como no teor de minerais e de constituintes bioquímicos das plantas (Sharma *et al.*, 2014). Contudo, o seu efeito positivo está dependente da espécie e cultivar da planta, das condições ambientais, da dose, e do período de aplicação do produto (Lisiecka *et al.*, 2011).

Existe um grande número de elementos sintetizados pelas plantas, com possível extração a partir de resíduos vegetais. Como nem todas as plantas têm a capacidade de produzir e acumular estes elementos em quantidade suficiente para tolerar o stress ambiental, a solução passa pela aplicação de forma exógena de produtos constituídos por esses mesmos componentes naturais (Ashraf & Fooland, 2007). Estes elementos contidos nos produtos, podem atuar como estímulo às plantas, em condições de stress biótico ou abiótico.

2.8. Bioestimulantes utilizados neste trabalho

2.8.1. Glicina betaína

A glicina betaína (GB) é um termo usado em sentido genérico para designar compostos ricos em azoto derivados da betaína (trimetilglicina). A GB está presente em muitos microrganismos, plantas e animais (Rhodes & Hanson, 1993). Faz parte do grupo dos solutos compatíveis, que são pequenos metabolitos orgânicos, solúveis em água e não-tóxicos em altas concentrações. São frequentemente encontrados nos cloroplastos e plastos de diversas plantas, evitando a degradação da clorofila (Chen & Murata, 2008; Tian *et al.*, 2016), principalmente quando afetadas por stresses abióticos (Allard *et al.*, 1998). Por outro lado, há

autores que defendem que a substância se concentra mais nas mitocôndrias e citosol (Chen & Murata, 2008). Num estudo realizado em *Arabidopsis*, foi demonstrado que a maioria da GB se acumula nos órgãos em crescimento ativo, como as flores e os novos lançamentos, indicando uma fácil translocação deste metabolito no floema (Sulpice *et al.*, 2003).

Do grupo dos solutos compatíveis, a GB é a que exerce maior efeito sobre os stresses ambientais (Sakamoto & Murata, 2002), tendo sido comprovado por vários autores em diversas espécies de plantas e stresses abióticos (Chen & Murata, 2008). Muitas espécies de plantas acumulam glicina betaína naturalmente, mas em baixas concentrações, sendo por vezes insuficiente para suscitar uma regulação osmótica (Tian *et al.*, 2016).

Desde cedo que se descobriu que a glicina betaína está presente em maior quantidade em plantas resistentes à salinidade ao contrário do que se passa em plantas sensíveis, onde o teor de GB é reduzido, tal como demonstraram Storey e Jones (1975). De um estudo realizado por Ghuge *et al.* (2011) resultou um aumento de 208 %, comparativamente ao controlo, na concentração de glicina betaína em plantas da família das *Brássicas* quando sujeitas a uma concentração de 200 mmol⁻¹ de NaCl no solo. Siddiqui *et al.* (2009) também demonstraram um aumento no teor de GB em *brassicacae* sujeitas a diversos níveis de salinidade. A GB tem a capacidade de atenuar os distúrbios no equilíbrio de água e iões nas células, causados pela salinidade (Ma *et al.*, 2006; Yu *et al.*, 2003). Segundo Ohnishi e Murata (2006), a glicina betaína consegue reverter o efeito inibitório causado pelo o stress salino, mantendo no cloroplasto a integridade dos tilacoides e consequentemente evitando o dano dos fotossistemas.

A GB tem ainda, um papel importante nos mecanismos de defesa da planta em condições de salinidade combinada com elevadas temperaturas, ao manter os valores de K⁺ altos, e deste modo reduzir o rácio Na⁺/K⁺, levando a uma maior quantidade de água nas células e consequente acréscimo do desempenho na fotossíntese em dadas condições (Rivero *et al.*, 2014).

Contudo, há culturas que não acumulam GB em quantidade suficiente para tolerar algum tipo de stress ambiental, pelo que a substância pode ser aplicada exogenamente nas plantas através das folhas (Park *et al.*, 2006), ou pelas raízes (Chen & Murata, 2008). Diversos estudos demonstram que aplicação exógena de glicina betaína aumenta significativamente a tolerância de várias culturas face a diversos stresses, como por exemplo, a tolerância do arroz à salinidade (Lutts, 2000), do tomate à salinidade e altas temperaturas (Makela *et al.*, 1998), ou da *Arabidopsis* às baixas temperaturas (Weibing & Rajashekar, 2001).

Para além do efeito que tem em situações de salinidade e temperaturas extremas, a glicina betaína também atua ao nível do stress hídrico. A GB ao ser ministrada exogenamente,

aumenta a quantidade de água nas folhas e a turgidez em situações de seca, em plantas de girassol, tomate, milho, algodão e trigo (Iqbal *et al.*, 2008; Makela *et al.*, 1998; Agboma *et al.*, 1997, Gorham *et al.*, 2000; Diaz-Zarita *et al.*, 2001). Porém, sugerem que o efeito da substância no aumento do potencial hídrico está dependente da fase de desenvolvimento em que a planta se encontra quando é tratada com GB, sendo que o resultado é mais pronunciado quando o déficit hídrico ocorre na fase vegetativa e reprodutiva (Iqbal *et al.*, 2008). Allard e colaboradores (1998) demonstraram que a GB tem também influencia na tolerância das plantas de trigo face a situações de baixas temperaturas.

2.8.2 Ácido poliglutâmico

O ácido poliglutâmico (PGA) é um aminoácido biodegradável, produzido naturalmente a partir de unidades repetidas de ácido L-glutâmico, ácido D-glutâmico, ou de ambos (Shih & Van, 2001; Ogunleye *et al.*, 2015). Apresenta diversas propriedades e é atualmente utilizado em vários setores, como o alimentar, saúde, tratamento de águas residuais, entre outros (Ogunleye *et al.*, 2015). Por ser um composto rico em azoto é também usado na agricultura, apresentando diversos efeitos benéficos nas plantas.

A função do PGA depende do organismo que o produz e das condições ambientais em que vive (Ogunleye *et al.*, 2015). Este composto pode auxiliar o organismo a sobreviver em condições ambientais adversas (McLean *et al.*, 1990). Por exemplo, algumas bactérias utilizam esta substância para baixar elevadas concentrações de sal em alguns meios, permitindo-lhes sobreviver em ambientes hostis (Hezayen *et al.*, 2001).

Na agricultura, é considerado um biofertilizante amigo do ambiente, a par com outros aminoácidos (Shih & Van, 2001). Promove a absorção de nutrientes e potencia o desenvolvimento da cultura do pepino (Wang *et al.*, 2008), e do pak-choi (Zhang *et al.*, 2017). Wang *et al.* (2008) promoveram a produção de ácido poliglutâmico a partir da atividade de *Bacillus subtilis*, usando como substrato da fermentação, resíduos de soja e batata-doce. Estes autores referem ainda que o PGA tem a capacidade de aumentar o peso seco e o número de raízes e lançamentos aéreos na cultura do pepino. Por sua vez, Chunhachart *et al.* (2014) demonstraram através de um estudo realizado em *Brassica chinensis* L., que o PGA atua na redução da fitotoxicidade causada por contaminações de chumbo no solo.

2.8.3. Algas

As algas são organismos aquáticos fotossintéticos, com elevada importância comercial em larga escala (Bai *et al.*, 2007). Estima-se que existam mais de 40,000 espécies de algas já identificadas, mas muitas mais estão por descobrir (Suganya *et al.*, 2016). No grupo das algas marinhas estão incluídas cianobactérias, microalgas eucarióticas e algas pluricelulares que são responsáveis por 40 a 50% da fotossíntese global do planeta (Esquível, 2015).

Em geral, as algas podem dividir-se em dois principais grupos: as macroalgas e as microalgas. As macroalgas são algas marinhas pluricelulares macroscópicas que habitam o fundo do mar. Dividem-se em três principais grupos consoante a sua pigmentação: *Phaeophytas* ou algas castanhas, *Rhodophytas* ou algas vermelhas, e *Chlorophytas* ou algas verdes, sendo as algas castanhas as mais comuns (Suganya *et al.*, 2016; Khan *et al.*, 2009). Por sua vez, as microalgas são algas microscópicas unicelulares, que podem viver individualmente ou em colónias (Suganya, *et al.*, 2016). As microalgas são as plantas com crescimento mais rápido que se conhece, desenvolvem-se entre 10 a 50 vezes mais rapidamente do que as plantas terrestres, e apresentam uma grande taxa de fixação de CO₂ (Che *et al.*, 2011).

As algas são fonte de variadas substâncias úteis em diversas áreas de utilização, nomeadamente na agricultura, onde alguns componentes das algas apresentam efeitos benéficos ao nível da fisiologia das plantas, ajudando-as a adaptar a condições desfavoráveis do meio envolvente (Matysiak *et al.*, 2011). São também utilizadas na alimentação, extração de ficocolóides, compostos antivirais e antibacterianos, bem como na agricultura em rações e biofertilizantes (Pereira, 1998). As microalgas em particular, são utilizados na produção de biocombustíveis, aditivos alimentares, produtos de saúde e beleza, entre outros (Ho *et al.*, 2011).

A utilização de algas na agricultura é um conceito ancestral em Portugal que remonta ao século XIV (Vieira e Santos, 1995). Desde de cedo, se começou a utilizar algas como fertilizante, dado a sua diversidade de macro e micronutrientes, vitaminas, proteínas, aminoácidos, polissacáridos, antioxidantes, hormonas vegetais (citoquininas, auxinas, ácido abscísico, entre outras) e hidratos de carbono insolúveis, que melhoram as propriedades do solo (Esquível, 2015; Zodape *et al.*, 2011). As algas melhoram o solo ao alterar as propriedades físicas, químicas e biológicas, que influenciam o crescimento das plantas, uma vez que, aumentam a capacidade de retenção de água e promovem o desenvolvimento de microrganismos benéficos (Khan *et al.*, 2009).

As algas são uma fonte pouco dispendiosa de nutrientes orgânicos e inorgânicos (Di Caprio *et al.*, 2018), constituindo um substituto viável aos fertilizantes inorgânicos

convencionais (Saadaoui *et al.*, 2018). Possuem um grande número de benefícios para as plantas, como promover o enraizamento, aumentar a produtividade, aumentar a taxa fotossintética e proteção contra pragas e doenças (Sharma *et al.*, 2014; Sultana *et al.*, 2005), uma vez que, aumentam a capacidade de absorção de água, a síntese de ácidos nucleicos, a produção de clorofila, a absorção de iões nas plantas e têm ação ao nível da respiração das plantas (Khan *et al.*, 2009; Craigie, 2011). Para além disso, ajudam as plantas a tolerar stresses abióticos, como o calor e seca (Zhang & Schmidt, 2000), salinidade (Nabati *et al.*, 1994), entre outros.

Bai *et al.*, (2007) demonstraram que a aplicação foliar de extratos de algas promove o alongamento das raízes e dos lançamentos aéreos das plantas, na ordem dos 20 a 35%. Saadaoui *et al.*, (2018), para além do aumento do crescimento aéreo e radicular, relatam um acréscimo no teor de clorofila em plantas de palmeira tamareira e na quantidade de macronutrientes disponíveis no solo, comparado com a aplicação de fertilizantes inorgânicos. Adicionalmente, os mesmos autores referem que a quantidade de metais pesados no solo após a aplicação de algas foi muito semelhante ao controlo, apesar de as algas terem capacidade de absorver metais pesados e a sua utilização em excesso poder afetar o pH do solo e, conseqüentemente, comprometer o crescimento das plantas (Saadaoui *et al.*, 2018). Em culturas hortícolas, estudos referem aumentos na velocidade de germinação, no desenvolvimento das plantas e na produção floral na cultura do tomate, após aplicações de bioestimulantes à base de algas (Garcia-Gonzalez & Sommerfeld, 2016).

Contudo, é importante conhecer os processos bioquímicos associados ao efeito deste tipo de produtos, nomeadamente os seus constituintes e as interações que existem entre eles e com a planta. O resultado final está dependente do produto, mas também da dose aplicada (Sharma *et al.*, 2014) e do genótipo da planta (Basak, 2008).

Primordialmente, as algas eram colhidas e secas junto ao local de colheita e mais tarde transportadas para os campos agrícolas (Esquível, 2015). Atualmente, a indústria de fertilizantes tem apostado fortemente neste setor, pelo que existe no mercado alguma diversidade de produtos que têm como base esta matéria prima.

2.8.3.1. *Ecklonia maxima*

Ecklonia maxima é uma macroalga, pertencente ao grupo das algas castanhas (Aremu *et al.*, 2015), e atualmente é usada como base de diversos produtos estimulantes comerciais.

Segundo Aremu *et al.* (2015) esta alga estimula o desenvolvimento radicular, e não apresenta efeito significativo ao nível da parte aérea. Por outro lado, Roupheal *et al.* (2017) referem que a aplicação *Ecklonia maxima* promoveu um aumento de 11% da área foliar em plantas de aboborinha. Os mesmos autores referem ainda que em condições de salinidade, a aplicação desta espécie de algas aumentou a produtividade, o peso da biomassa, bem como a qualidade dos frutos. Para além disso, promoveu um aumento do teor de potássio e uma redução da concentração de sódio nas folhas, associado a efeitos de diluição provocados pela aplicação da alga. Matysiak *et al.* (2011) referem que a aplicação desta macroalga promove o aumento do peso das raízes e caules do milho. Na cultura do feijão, Kocira *et al.* (2018), verificaram um aumento do teor de antocianinas nas sementes, um aumento da concentração de compostos fenólicos e um aumento da produção, após aplicações da macroalga. Alguns autores defendem que a aplicação de *Ecklonia maxima* melhora as relações hídricas nas folhas e mantém a pressão e o crescimento das células (Khan *et al.*, 2009; Battacharyya *et al.*, 2015).

2.8.3.2. *Scenedesmus sp.*

Scenedesmus sp. é uma microalga verde unicelular que apresenta atividade antibacteriana (Jena *et al.*, 2014). É definida como uma microalga oleaginosa (Ma *et al.*, 2017), que tem a capacidade de acumular e produzir lípidos (Liu *et al.*, 2012), proteínas, polissacáridos (Breuer *et al.*, 2012; Breuer *et al.*, 2013), e outros compostos, como a luteína (Di Caprio *et al.*, 2015) e as auxinas (Mazur *et al.*, 2001). Para além destas características, tem também a capacidade de fixar elevados teores de CO₂ e de amónio, e elevado potencial para a produção de biodiesel dado o seu o seu teor em ácidos gordos (Gouveia & Oliveira, 2009; Mandal & Mallick, 2009). É considerada de fácil produção e rápido crescimento (Skulberg, 2004), tolerante ao défice de azoto e a condições de stress salino e de alta luminosidade (Pirastru *et al.*, 2012).

Atualmente, é usada essencialmente na produção de biocombustíveis e na fixação de CO₂, mas existem algumas referências sobre a sua aplicação na agricultura, como é o caso do estudo desenvolvido por Garcia-Gonzalez (2014) na cultura do tomate, que demonstrou um efeito positivo da aplicação foliar e da incorporação ao solo de extrato da microalga *Scenedesmus dimorphus*. No estudo, o autor refere um acréscimo na produtividade e um maior crescimento e desenvolvimento dos tomateiros.



3. Materiais e métodos

3.1. Material vegetal e localização dos ensaios

Foram realizados dois ensaios, que se desenrolaram em locais distintos, no mesmo período de tempo. Um dos ensaios foi efetuado em vasos durante 126 dias, no Horto de Química Agrícola Boaventura de Azevedo do Instituto Superior de Agronomia (38°42'29.0"N 9°11'05.9"W). O outro ensaio decorreu num campo comercial da empresa Emergosol, localizado na localidade de São Pedro da Cadeira, concelho de Torres Vedras (39°03'49.5"N 9°22'20.8"W).

As sementes de broccolini utilizadas nos ensaios são da variedade Inspiration F1, provenientes da empresa Sakata®, uma vez que é uma cultivar de broccolini largamente produzida e comercializada pela empresa Emergosol. A germinação foi realizada em placas alveoladas, com substrato de turfa negra, nos viveiros da empresa Campoeste em A-dos-Cunhados. Esta cultivar é de utilização restrita, sendo que apenas as empresas ou produtores autorizados poderão fazer produção da mesma.



Figura 3 - Vista aérea da parcela utilizada no ensaio em São Pedro da Cadeira.

3.2. Bioestimulantes

No presente estudo foram utilizados três bioestimulantes comerciais da empresa EDF&MAN, dois contendo composto ricos em azoto e um terceiro contendo uma macroalga comercial (*Ecklonia maxima*). Foi também usado como bioestimulante um extrato da microalga (*Scenedesmus obliquus*). Esta última tem diversas aplicações na indústria, e no ensaio pretendeu-se verificar a sua aplicabilidade na agricultura, nomeadamente testar as suas capacidades estimulantes. A microalga *Scenedesmus obliquus* foi produzida na Algafarm em Pataias-SECIL e seca e preparada pela empresa Allmicroalgae – Natural Products.

Os bioestimulantes comerciais, ricos em azoto, têm como composto base a glicina betaína e o ácido poliglutâmico. São de origem vegetal e não têm incorporação de aditivos químicos. A sua extração é feita a partir de resíduos de beterraba sacarina e da fermentação de farinha de leguminosas, respetivamente.

Por outro lado, a macroalga *Ecklonia maxima* deriva de um processo mecânico, que segundo a empresa produtora, em apenas 8 horas após a colheita conseguem obter o produto comercial. Esta rapidez do processo permite manter inalterados todos os reguladores naturais de crescimento das plantas. A composição e características dos produtos comerciais utilizados no ensaio podem ser observados nos quadros 1 e 2.

Quadro 1 - Composição dos produtos comerciais utilizados no estudo

Produto	Composição	Reação (pH)
<i>Vegetal B45</i>	Azoto (N) total orgânico 4,5% Azoto (N) orgânico 4,5% Óxido de Potássio (K ₂ O) solúvel em água 5,0% Glicina betaína 25% Matéria orgânica 24% Aminoácidos 4%	11,5
<i>Gamma PGA</i>	Azoto (N) total orgânico 6,0% Azoto (N) orgânico 6,0% Zinco (Zn) solúvel em água 2,0% Zinco (Zn) EDTA 2,0% Ácido poliglutâmico 3,0% Proteína 6,0% Açúcares 3,5%	5,5
<i>Algaman B</i>	Boro (B) solúvel em água 2,0% Auxinas* 11 mg/L Citoquininas* 0,031 mg/L *Provenientes da alga <i>Ecklonia maxima</i>	-

Foi quantificado o teor de proteína da microalga *Scenedesmus obliquus* através do método de Bradford. O valor obtido foi de 0,1 mg de proteína por mL de solução, ou seja, 0,1 g de proteína por cada litro de solução de microalgas, que corresponde a um nível de proteína de 10%. O valor está entre os valores de referência segundo Abdelkhalek *et al.* (2016), que indica um valor entre 3-45% para o nível de proteína em microalgas do género *Scenedesmus*.

Quadro 2 - Características dos produtos comerciais utilizados no estudo.

Produto	Efeitos anunciados	Recomendação de aplicação	Custo médio de cada aplicação/Ha (€)
Vegetal B45	<ul style="list-style-type: none"> -Redução da sensibilidade ao stress térmico, de salinidade e hídrico -Aumento da atividade fotossintética e de fixação de azoto -Contribui para o aumento do prazo de conservação das produções agrícolas pós-colheita 	Cada 7-10 dias durante o desenvolvimento vegetativo	30
Gamma PGA	<ul style="list-style-type: none"> -Aumento da disponibilidade hídrica e de nutrientes -Aumento do desenvolvimento radicular -Aumento da produção e qualidade das culturas -Confere maior resistência à salinidade -Elevada capacidade humectante, uma vez que o PGA é um composto muito hidrofílico 	Intervalos de 10-12 dias entre aplicações	50
Algaman B	<ul style="list-style-type: none"> -Aumento do tamanho das raízes e melhoria da nutrição -Melhora a resistência a baixas temperaturas e outros fatores de stress -Estimula o crescimento e facilita a reprodução -Favorece a assimilação e translocação de cálcio 	Desde das primeiras folhas verdadeiras até à colheita, 3-4 aplicações a cada 12-15 dias	50

3.3. Ensaio em vasos

3.3.1. Preparação do ensaio

Antes da instalação do ensaio foi necessário preparar o solo que serviu de suporte para a cultura. O solo foi primeiramente crivado a 5 mm, seguindo-se o enchimento dos vasos de plástico, quimicamente inertes, de forma troncocônica. Como se tratavam de vasos de 3 litros e a densidade aparente do solo determinada foi de 1,5, procedeu-se ao doseamento de 4,5 kg de solo em cada vaso.

Após o enchimento, os vasos foram preparados e colocados no Horto de Química Agrícola Boaventura de Azevedo do Instituto Superior de Agronomia, sobre uma plataforma móvel montada em carris, que permitem alternar a permanência do ensaio dentro ou fora da estufa. O ensaio permaneceu na maioria do tempo fora do abrigo, sendo apenas recolhido para o interior quando havia previsão de precipitação.

As plantas foram transplantadas da placa alveolada para os vasos no dia 10 de janeiro de 2018, logo após a execução da fertilização de fundo e salinização do solo. Cada vaso conteve 1 planta, num total de 40 vasos.

Os vasos foram previamente numerados de 1 a 40 e colocados na plataforma móvel, distribuídos cinco por cada tabuleiro. Uma vez que os tabuleiros são rotativos, procedeu-se regularmente à rotação de cada um deles de modo a promover igualdade de circunstâncias nos vasos, nomeadamente ao nível da temperatura e intensidade luminosa.

3.3.2. Caracterização do solo

O solo utilizado no ensaio é de textura arenosa grosseira, correspondente à camada superficial (0-20 cm) de um Arenossolo háplico. As características do solo podem ser observadas no quadro 3.

Quadro 3 - Características do solo utilizado no ensaio.

Parâmetro	Resultado	Parâmetro	Resultado
Condutividade elétrica (mS/cm)	0,21	Razão C/N	1,23
pH (H ₂ O)	6,6	Sódio (bases de troca) (cmol(+)/kg)	0,07
Matéria orgânica (%)	1,02	Potássio (bases de troca) (cmol(+)/kg)	0,16
Fósforo extraível (P ₂ O ₅) (mg/kg)	>200	Cálcio (bases de troca) (cmol(+)/kg)	6,39
Potássio extraível (K ₂ O) (mg/kg)	108	Magnésio (bases de troca) (cmol(+)/kg)	0,81
Azoto nítrico (N-NO ₃ ⁻) (mg/kg)	24,41	Soma das bases de troca (cmol(+)/kg)	7,43
Azoto amoniacal (N-NH ₄ ⁺) (mg/kg)	7,23	CTC efetiva (cmol(+)/kg)	7,5
Cálcio extraível (Ca) (mg/kg)	1280	Grau de saturação em bases (%)	99,1
Magnésio extraível (mg/kg)	99	Calcário total (CaCO ₃) (%)	<0,5

3.3.3. Salinização e fertilização do solo

A salinização do solo foi efetuada em 20 dos 40 vasos, imediatamente antes da transplantação. Foram colocadas 9 g de cloreto de sódio (NaCl) por vaso, que corresponde a 2 g do sal por cada kg de solo. O NaCl foi homogeneizado individualmente com o solo de cada vaso.

Para executar a fertilização de fundo, foram elaborados cálculos com base na análise sumária do solo e nas recomendações de fertilização para a cultura do brócolo presentes no *Manual de Fertilização das culturas*. No cálculo das necessidades por planta, foram feitas conversões dos valores a aplicar por hectare. Considerando uma população de 37 000 plantas por hectare determinaram-se as quantidades de nutrientes a ministrar a cada planta.

Quadro 4 - Quantidades determinadas a aplicar de fundo por planta.

Nutriente	Quantidade necessária por planta (g)
Azoto	0,5
Potássio	1
Magnésio	0,25
Cálcio	0,25
Boro	0,004

Recorrendo aos valores da massa molar de cada elemento, foram determinadas as quantidades de cada adubo a aplicar por vaso. Com a dose necessária calculada prepararam-se duas soluções nutritivas, que foram distribuídas de igual forma em todos os vasos, 40 mL de cada uma por planta.

Quadro 5 - Fertilizantes aplicados de fundo por planta.

Fertilizante	Quantidade aplicada por planta (g)
Nitrato de potássio (KNO_3)	2,59
Nitrato de cálcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$)	1,48
Sulfato de magnésio ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	2,54
Ácido bórico (H_3BO_3)	0,023

As fertilizações de cobertura foram realizadas na 6ª, 10ª e 15ª semanas do ciclo da cultura. Na primeira fertilização de cobertura, a 21 de fevereiro de 2018, aplicaram-se os mesmos fertilizantes, na mesma proporção, que foram aplicados na adubação de fundo, à exceção do ácido bórico, que neste caso não foi aplicado. Procedeu-se ainda, à aplicação de uma solução com a mistura de micronutrientes Fertilon Combi da empresa Comp Expert®. Este fertilizante microgranulado é constituído por manganês (4%), ferro (4%), cobre (1,5%), zinco (1,5%), boro (0,5%), molibdénio (0,1%) e magnésio (1,9%). Em cada vaso aplicaram-se 3 mg da mistura de micronutrientes numa solução de 40 mL.

Por sua vez, a segunda fertilização de cobertura foi realizada no dia 22 de março. Foram aplicados, sob a forma de solução, nitrato de amônio (1,43 g por vaso) e a mistura de nutrientes Fertilon Combi (3 mg por vaso). Por fim, foi realizada uma fertilização a 18 de abril, com 1 g de nitrato de amônio e 3 mg de Fertilon Combi por vaso.

3.3.4. Delineamento experimental e análise estatística

O ensaio foi realizado com delineamento fatorial a 2 fatores, salinidade e bioestimulante. O fator salinidade tem 2 níveis, solo salinizado e solo não salinizado. O fator bioestimulantes tem 5 níveis correspondentes aos 5 produtos aplicados.

Para a realização do ensaio foram utilizadas quatro repetições por modalidade. No total existiram 10 modalidades correspondentes a quatro produtos e uma testemunha, divididas em duas séries. Uma série com 20 vasos onde foi adicionado o NaCl e uma outra série com 20 vasos sem a adição de NaCl.

Quadro 6 - Caracterização das modalidades

Salinidade	Modalidade	Bioestimulante	Nº do vaso
A – s / NaCl	1	Testemunha	1-4
A – s / NaCl	2	Glicina betaína	5-8
A – s / NaCl	3	Ácido poliglutâmico	9-12
A – s / NaCl	4	<i>Ecklonia maxima</i>	13-16
A – s / NaCl	5	<i>Scenedesmus sp.</i>	17-20
B – c / NaCl	6	Testemunha	21-24
B – c / NaCl	7	Glicina betaína	25-28
B – c / NaCl	8	Ácido poliglutâmico	29-32
B – c / NaCl	8	<i>Ecklonia maxima</i>	33-36
B – c / NaCl	10	<i>Scenedesmus sp.</i>	37-40

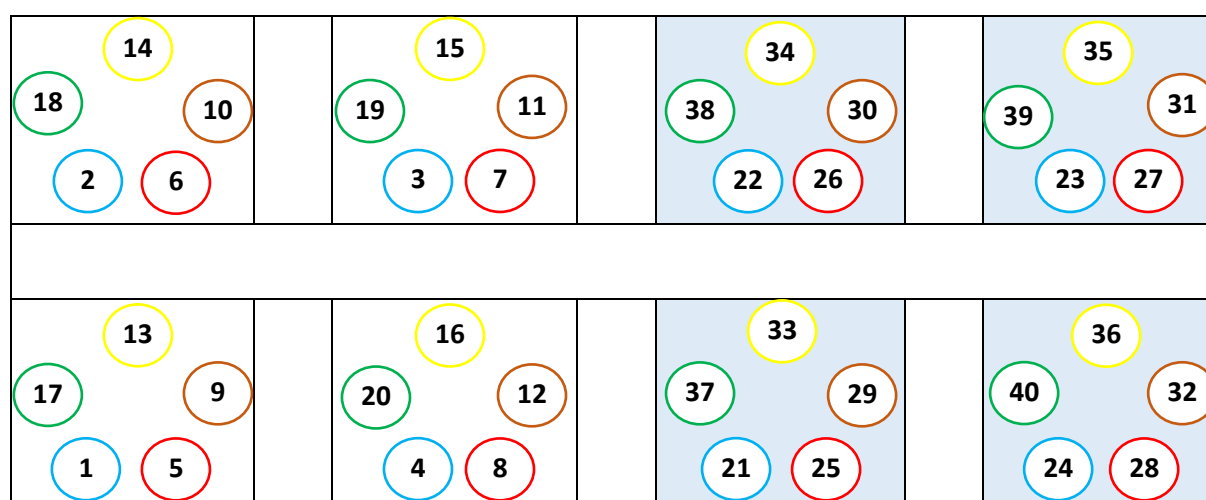


Figura 4 - Esquematização do posicionamento e distribuição dos vasos.



Figura 5 - Disposição dos vasos e plantas (foto registrada no dia da plantação).

O tratamento dos resultados experimentais foi efetuado com recurso a análise de variância (ANOVA), utilizando o programa *Statistix* versão 9, para avaliar o efeito das modalidades nas variáveis experimentais estudadas, e a comparação de médias à posteriori, quando a ANOVA indicou efeito significativo das modalidades experimentais, através do teste da “diferença mínima significativa – DMS” (LSD - least significant difference) para $\alpha=0,05$.

3.3.5. Rega

A supressão das necessidades hídricas das plantas foi executada tendo em conta a diferença de peso de cada vaso. Para o tipo de solo usado no ensaio, considerou-se uma capacidade máxima de retenção de 240 g/kg de solo. Uma vez que se pretendia garantir o arejamento, foi considerada apenas 80% da capacidade máxima de retenção do solo, ou seja, 192 g/kg de solo. Como neste caso, existiam 4,5 kg de solo, obtemos 864 g de água por vaso. Somando a este valor, o peso do solo, o peso do vaso vazio e o peso do prato, obtemos uma referência inicial de 5,52 kg para que as plantas se encontrem em conforto hídrico. Este valor referência foi aumentando ao longo do ciclo das plantas, uma vez que as necessidades hídricas da cultura também aumentam, bem como o peso correspondente às plantas.

Semanalmente todos os vasos foram pesados e regados até atingir o valor de referência. Regularmente, ao longo da semana procedeu-se à pesagem de uma amostra aleatória de vasos a fim de verificar a evolução do consumo de água e executar a regas consoante a necessidade. Para que os sais da água não exercessem influencia nos resultados do ensaio, as regas foram realizadas utilizando água desionizada.



Figura 6 - Pesagem dos vasos a fim de regar a quantidade adequada.

3.3.6. Preparação das soluções e aplicação

Ao longo do ensaio foram realizadas as aplicações dos produtos em estudo com intervalos de duas semanas entre cada uma. A primeira aplicação foi realizada no dia 25 de janeiro quando as plantas se encontravam com duas semanas de ciclo.

Em cada dia de aplicação foram realizadas as diluições dos produtos comerciais. As soluções foram preparadas tendo em conta a densidade de cada um e a recomendação que se encontra no rótulo dos produtos. Neste sentido, os cálculos levaram ao doseamento de 4,17 mL de Vegetal B45 e de Gamma PGA para 1 L de água, preparados separadamente. No caso do Algaman B, a recomendação indica metade da concentração e uma vez que a densidade é igual aos anteriores, a dose colocada é metade, 2,08 mL em 1 L de água.

Por sua vez, o extrato da microalga *Scenedesmus obliquus* apresentava características diferentes, encontrando-se no estado sólido, visto que a matéria prima foi

desidratada. Devido ao facto de esta se encontrar altamente concentrada (60 vezes concentrada), apenas foi necessário diluir 1 g de microalga seca em 1 L de água desionizada. Esta preparação ocorreu dois dias antes da primeira aplicação, e após ser agitada, a suspensão foi dividida em frações e congelada a -20 °C até ser utilizada. Para além de conservar, o congelamento e mais tarde o descongelamento ajudam a quebrar a parede e a membrana celular das microalgas e assim libertar os compostos que poderão ter influência no desenvolvimento das plantas.

No dia de cada aplicação, uma suspensão de microalgas foi descongelada, seguindo-se a sua colocação no homogeneizador Ultra-Turrax T25 (IKA-Labortechnik). A homogeneização teve como finalidade a lise das células e para isso foram executadas 5 séries de pulsos de 30 segundos cada um à velocidade máxima (2400 r.p.m) no Ultra-Turrax T25, alternando com períodos de pausa em que a solução era colocada em gelo para arrefecer. Após este processo, a solução encontrava-se pronta a aplicar, tal como as soluções preparadas a partir dos produtos comerciais.



Figura 7 - Frações com a suspensão de microalga *Scenedesmus obliquus*.



Figura 8 - Homogeneização da solução de microalga.

Em todas as soluções aplicadas, foi adicionado o molhante Genapol (Bayer CropScience) com o objetivo aumentar a aderência da calda às folhas das plantas.

A quantidade de calda aplicada por planta foi aumentando gradualmente à medida que as plantas se desenvolviam. Na primeira aplicação, foi ministrado 2,5 mL de solução em cada planta, sendo que nas pulverizações finais foi aplicado um volume de 10 mL em cada planta.

Quadro 7 - Parametrização das aplicações de soluções bioestimulantes.

Data de aplicação	Volume aplicado por planta
25 de janeiro	2,5 mL
8 de fevereiro	5 mL
22 de fevereiro	5 mL
8 de março	10 mL
22 de março	10 mL
5 de abril	10 mL
18 de abril	10 mL
3 de maio	10 mL

Apesar dos produtos poderem ser aplicados de duas formas distintas (foliar ou fertirrega), no presente estudo optou-se pela aplicação foliar com recurso a pulverizadores. O tratamento foi realizado de forma individual em cada vaso. O pulverizador foi devidamente lavado aquando da mudança de solução.



Figura 9 - Aplicação da solução a uma planta.

3.3.7. Metodologia das observações e avaliação de parâmetros

A fim de avaliar o desenvolvimento das plantas, foram realizadas medições de diversos parâmetros bem como um registo fotográfico ao longo do ciclo da cultura. Nos primeiros estágios do desenvolvimento das plantas antes da fase reprodutora, nas semanas entre as aplicações dos bioestimulantes, procedeu-se à medição do teor de clorofila, índice de refletância fotoquímica, bem como a contagem das folhas novas surgidas.

Para quantificar o teor de clorofila das folhas dos broccolinis utilizou-se o aparelho SPAD 502 (Konica, Minolta). Foram feitas medições nas folhas mais velhas localizadas na parte inferior da planta, nas folhas mais desenvolvidas e nas folhas jovens de cada planta.

Por sua vez recorreu-se a um medidor PlantPen PRI 200, que permite avaliar o estado da planta através da quantificação do índice de refletância fotoquímica utilizando dois feixes de luz um a 531 nm e outro a 570 nm, que deteta alterações na composição das clorofilas e dos carotenoides. As variações dos valores medidos dos pigmentos são indicativas da eficiência da utilização de luz, assimilação de dióxido de carbono, ou do nível de stress hídrico.



Figura 10 - Medição com o aparelho SPAD 502.



Figura 11 - Medição com o aparelho PlantPen PRI 200.

Oportunamente, a fluorescência de clorofila *a* foi medida *in vivo* usando o aparelho analisador da eficiência fotossintética PEA (Plant Efficiency Analyzer – Hansatech) na 13^a e 18^a semanas do ensaio. As medições foram feitas na zona média da planta, nas folhas totalmente expandidas. A adaptação ao escuro foi feita durante 10 minutos usando pinças apropriadas para esta finalidade. O tecido foliar foi então sujeito durante 1 segundo a um pulso de luz saturante ($3500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), de intensidade suficiente para assegurar o fecho de todos os centros de reação (RC) do fotossistema II, afim de se obter a curva rápida de indução de fluorescência da clorofila (OJIP). Todos os padrões biofísicos da curva OJIP são gravados permitindo calcular automaticamente vários parâmetros tais como índice de desempenho (PI, *Performance Index*) e a eficiência quântica do fotossistema II (F_v/F_m) como descrito em Silvestre *et al.* (2014).

A meio do ciclo da cultura (semana 12), bem como no final do ensaio foi medido com uma craveira o diâmetro do caule na base da planta para avaliar a sua robustez.

Na semana 12 efetuou-se a primeira colheita de rebentos de broccolinis. Os mesmos foram pesados em fresco a fim de avaliar o efeito dos bioestimulantes sobre a produção. As sucessivas colheitas foram realizadas mediante apreciação visual do estado adequado para consumo, sendo em média efetuadas 2 vezes por semana.

Por fim, no final do ciclo da cultura, foi realizada a quantificação da biomassa. Em cada vaso foi cortada a parte aérea da planta para a determinação do peso fresco e peso seco, este último obtido após secagem do material biológico em estufa a 60 °C durante 4 dias.

Após o término do ensaio, foi conservada uma amostra de solo de cada um dos vasos para mais tarde se proceder à medição do pH e condutividade elétrica (CE). Para isso foi realizada uma extração com água, seguindo-se a medição através de 2 aparelhos que medem os valores de pH e CE.



Figura 12 - Colheita dos rebentos de broccolinis.

3.4. Ensaio em campo comercial

3.4.1. Caracterização do ensaio e gestão da parcela - Local do estudo

O ensaio no campo comercial da empresa Emergosol, localizado no município de Torres Vedras, decorreu durante o período compreendido entre 18 de janeiro de 2018 e 12 de maio de 2018.

O clima na Região Oeste de Portugal onde foi conduzido o estudo é tipicamente ameno, com invernos pouco rigorosos e verões frescos e ventosos, dada a forte influência atlântica. A temperatura média dos meses de inverno (janeiro, fevereiro) ronda os 11 °C, enquanto que nos meses mais quentes (julho, agosto e setembro) a temperatura média aproxima-se dos 20 °C (C.M. Torres Vedras, 2015).

Todas as operações culturais ficaram ao encargo da Emergosol, nomeadamente, a preparação do terreno, transplantação, sachas, tratamentos fitossanitários. Uma vez que esta planta decorreu num período invernal e por se tratar de uma cultura rústica, não foi instalado sistema de rega. A plantação foi realizada manualmente pelos funcionários da empresa. Neste ensaio foram utilizadas plantas provenientes do mesmo lote utilizado no ensaio que decorreu no Horto do ISA.

3.4.2. Delineamento experimental no campo

Para a realização do ensaio foram definidas quatro repetições por modalidade, dispostas ao acaso ao longo do campo. Existiram quatro modalidades correspondentes a três produtos e uma testemunha.

As plantas foram plantadas em camalhão, num compasso de 33 cm por 80 cm. Cada repetição correspondeu a um camalhão constituído por duas linhas. O ensaio foi composto no total por dezasseis camalhões ou trinta e duas linhas.

A marcação das diferentes modalidades em estudo foi feita recorrendo a sinalizadores coloridos.



Figura 13 - Ensaio em campo comercial na zona de Torres Vedras.

3.4.3. Caracterização do solo e Fertilização

O solo utilizado no ensaio de campo era de textura arenosa grosseira. As características do solo podem ser observadas no quadro 8.

Quadro 8 - Características do solo utilizado no ensaio de campo.

Parâmetro	Resultado	Parâmetro	Resultado
Condutividade elétrica (mS/cm)	0,09	Razão C/N	-
pH (H ₂ O)	5,3	Sódio (bases de troca) (cmol(+)/kg)	0,08
Matéria orgânica (%)	0,72	Potássio (bases de troca) (cmol(+)/kg)	0,27
Fósforo extraível (P ₂ O ₅) (mg/kg)	131	Cálcio (bases de troca) (cmol(+)/kg)	1,05
Potássio extraível (K ₂ O) (mg/kg)	147	Magnésio (bases de troca) (cmol(+)/kg)	0,22
Azoto nítrico (N-NO ₃ ⁻) (mg/kg)	-	Soma das bases de troca (cmol(+)/kg)	1,62
Azoto amoniacal (N-NH ₄ ⁺) (mg/kg)	-	CTC efetiva (cmol(+)/kg)	1,85
Cálcio extraível (Ca) (mg/kg)	211	Grau de saturação em bases (%)	87,6
Magnésio extraível (mg/kg)	0,22	Calcário total (CaCO ₃) (%)	<0,5

Como não foi instalado sistema de rega, as fertilizações foram efetuadas através de um distribuidor localizador. Foram efetuadas uma fertilização de fundo e uma cobertura (quadro 9).

Quadro 9 - Fertilizantes aplicados no ensaio de campo.

Data de aplicação	Fertilizantes	Quantidade
15/01/2018	Yaramila Complex (12-11-18)	500 kg/ha
15/01/2018	Folha de Ouro (3,3-0,8-0,6 + M.O.)	900 kg/ha
06/02/2018	Entec 26% (26-0-0)	300 kg/ha

3.4.4. Preparação das soluções de bioestimulantes

Quinzenalmente procedeu-se à aplicação dos produtos por via foliar com um pulverizador de dorso elétrico. A primeira aplicação ocorreu no dia 19 de janeiro de 2018, um dia após a transplantação. Nesta data apenas foi aplicado o produto Algaman B, segundo recomendações do fabricante, devido ao facto da alga *Ecklonia maxima* promover o enraizamento, daí ser importante ser aplicado o mais cedo possível após a transplantação. Nos restantes tratamentos, aplicaram-se todos os produtos, com as doses recomendadas nos rótulos.

As caldas foram preparadas em cada dia de aplicação. Em todas as caldas aplicadas, foi adicionado o molhante Genapol (Bayer CropScience) (100 mL/hL) com o objetivo aumentar a aderência da calda às folhas das plantas.

Quadro 10 - Parametrização das aplicações das soluções bioestimulantes.

Data de aplicação	Volume aplicado por bloco	Produtos aplicados	Dose
19 de janeiro	10 L	Algaman B	250 g/hL
2 de fevereiro	10 L	Todos	500 g/hL
16 de fevereiro	10 L	Todos	500 g/hL
6 de março	10 L	Todos	500 g/hL
21 de março	12 L	Todos	500 g/hL
29 de março	12 L	Todos	500 g/hL
17 de abril	12 L	Todos	500 g/hL
1 de maio	12 L	Todos	500 g/hL

3.4.5. Metodologia das observações e avaliação de parâmetros

O efeito dos bioestimulantes neste estudo foi avaliado através da quantificação do peso fresco dos rebentos colhidos ao longo das semanas. Periodicamente efetuaram-se colheitas de rebentos de 20 plantas em cada repetição, previamente marcadas de forma aleatória e procedeu-se à sua pesagem.

3.4.6. Avaliação da conservação

Foi realizado um ensaio de conservação a fim de verificar se as substâncias ensaiadas em campo promoviam o alargamento da vida útil pós-colheita. Foram colocadas 4 amostras de aproximadamente 305 g cada, correspondentes às colheitas dos diferentes tratamentos efetuados no campo, em caixas de plástico devidamente identificadas e permaneceram em câmara de conservação durante 2 meses a cerca de 7 °C.

Periodicamente, as amostras foram pesadas a fim de verificar a desidratação e consequente perda de peso, bem como o seu aspeto visual que foi registado fotograficamente.



4. Resultados experimentais e discussão

4.1. Ensaio em vasos

4.1.1. Crescimento das plantas

Ao longo do ensaio, foram proporcionadas as mesmas condições edafo-climáticas a todas as plantas em estudo. A única diferença prendeu-se com a adição de NaCl em metade dos vasos, bem como os diferentes bioestimulantes ministrados às diversas modalidades.

Em geral, as plantas broccolini apresentaram um desenvolvimento dentro do expectável, com as diferentes fases fenológicas a ocorrerem nos períodos esperados, dadas as condições e a fase do ano em que se desenrolou o estudo. Porém, das medições e avaliações de parâmetros efetuadas ao longo do ensaio, resultaram algumas diferenças de crescimento e desenvolvimento dos broccolinis entre as modalidades em estudo.

4.1.2. Número de folhas na planta

Nas semanas iniciais, até à 8ª semana, foram contabilizadas quinzenalmente o número de folhas por planta.

Foi realizada uma comparação estatística através de uma análise de variância (ANOVA), que indicou a influência do fator semana (tempo) e do fator salinidade, bem como da interação entre eles, no número de folhas existentes nas plantas. Por outro lado, verifica-se que não existe efeito dos bioestimulantes nos resultados apresentados.

Com recurso ao teste LSD (*least significant difference*) para um nível de significância de $\alpha=0,05$ verifica-se que na 1ª medição (4ª semana do ensaio), a média do número de folhas não difere significativamente no meio salino e não salino. Porém, a partir desta fase os valores médios do número de folhas são significativamente diferentes entre as duas séries, existindo uma menor produção foliar nos broccolinis cultivados em solo salinizado (Quadro 11).

Quadro 11 - Número de folhas médio na planta em função da semana e da salinidade do meio. Em cada coluna, as modalidades assinaladas com a mesma letra não diferem significativamente ($\alpha=0,05$).

Salinidade	Semana	Nº de folhas
Não Salino	4	7,0 <i>e</i>
Salino	4	6,7 <i>e</i>
Não Salino	6	8,8 <i>c</i>
Salino	6	8,4 <i>d</i>
Não Salino	8	10,3 <i>a</i>
Salino	8	9,3 <i>b</i>

O menor número de folhas nas plantas em stress, deverá não só estar relacionado com a toxicidade causada pelo excesso de sais sódicos no solo, como também com a redução da absorção de água pelas plantas que leva ao fecho dos estomas e consequentemente a uma redução na assimilação do carbono, culminando numa produção foliar inferior, tal como referido por Rodrigues (2005).

Após a 8ª semana do ciclo não se procedeu à contabilização do número de folhas, uma vez que a partir desta semana começou a fase reprodutora da cultura. O desenvolvimento dos rebentos e o surgimento rápido de novas folhas adventícias levariam a erros de contagem.

Na figura 14 é possível observar a inibição de crescimento induzida pelo stress salino, nas plantas broccolini. Durante a 4ª semana do ciclo, o desenvolvimento de todas as plantas era semelhante, sendo que na 8ª semana, a diferença de crescimento entre as duas séries já era evidente.

As plantas em fim de ciclo (18ª semana do ciclo) apresentaram grande parte das folhas claramente em senescência, mais amarelas nas plantas em solo não salino. As folhas das plantas em solo salino apresentavam uma tonalidade violácea indicando a presença de antocianinas. Rasheed *et al.* (2012) descrevem um decréscimo do teor deste pigmento em plantas de *Brassica napus* L. em condições de stress salino. Segundo Oh *et al.* (2011), as antocianinas estão relacionadas com o aumento da tolerância das plantas à salinidade, pelo que constitui um indício da existência de uma resposta face a condições de excesso de sais por parte do broccolini.

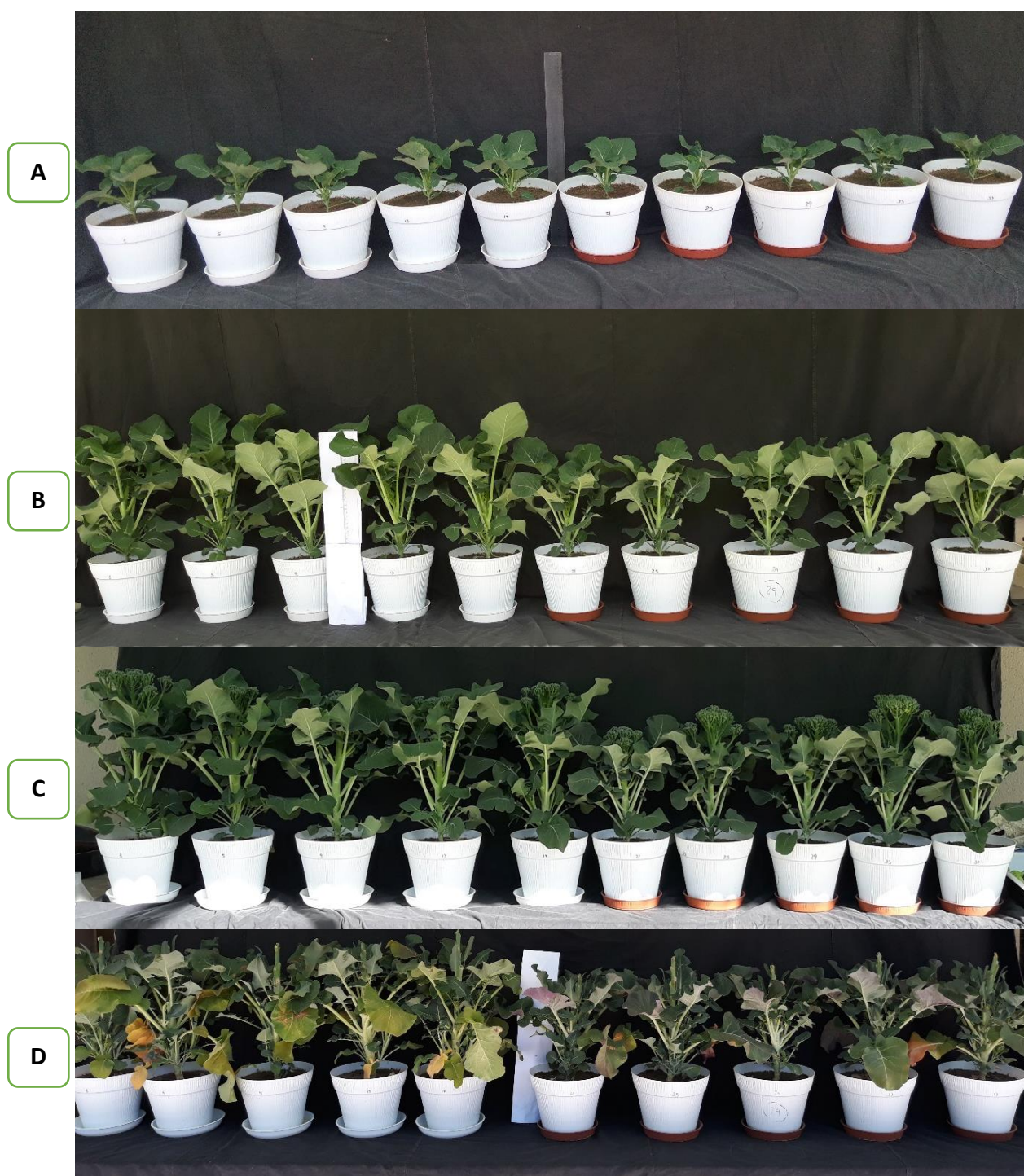


Figura 14 - Comparação entre as plantas em solo salino (prato castanho) e solo não salino (prato branco), em diversas semanas do ciclo assinaladas com as letras de A a D (A: 4ª semana; B: 8ª semana; C: 10ª semana; D: 18ª semana). Cada vaso corresponde a uma modalidade dos diferentes tratamentos em estudo (da esquerda para a direita: testemunha; glicina betaína; ácido poliglutâmico; *Ecklonia maxima*; *Scenedesmus* sp.).

4.1.3. Altura das plantas e diâmetro do caule

A análise estatística dos dados obtidos revelou que os bioestimulantes não afetaram a altura das plantas nem o diâmetro do caule. No entanto, observou-se um efeito negativo significativo do fator salinidade nos dois parâmetros, bem como do fator data (tempo) na medição do diâmetro do caule, visto que este foi avaliado duas vezes durante o ciclo da cultura.

Na avaliação destes dois parâmetros, foi possível observar claramente o efeito da salinidade nos resultados obtidos (Quadro 12). Plantas sujeitas ao meio salino, apresentaram uma altura e um diâmetro do caule tangente ao solo inferior às plantas em meio não salino (Quadro 12; Figura 14). Existiu assim, influência do NaCl ao nível do crescimento e desenvolvimento das plantas, tal como foi também observado por Ghuge *et al.* (2011), Benincasa *et al.* (2013), Bacarin *et al.* (2011) e, Kwon *et al.* (2000).

Quadro 12 - Parâmetros de crescimento do broccolini medidos no final do ensaio. Em cada coluna, as modalidades assinaladas com a mesma letra não diferem significativamente ($\alpha=0,05$).

Salinidade do meio	Diâmetro do caule (mm)	Altura da planta (cm)
Não salino	15,7 a	40,6 a
Salino	11,8 b	33,5 b

A meio do ensaio, foi apenas registado o valor do diâmetro do caule, cujo o resultado foi muito semelhante em proporção ao observado no final do ensaio (Figura 15).

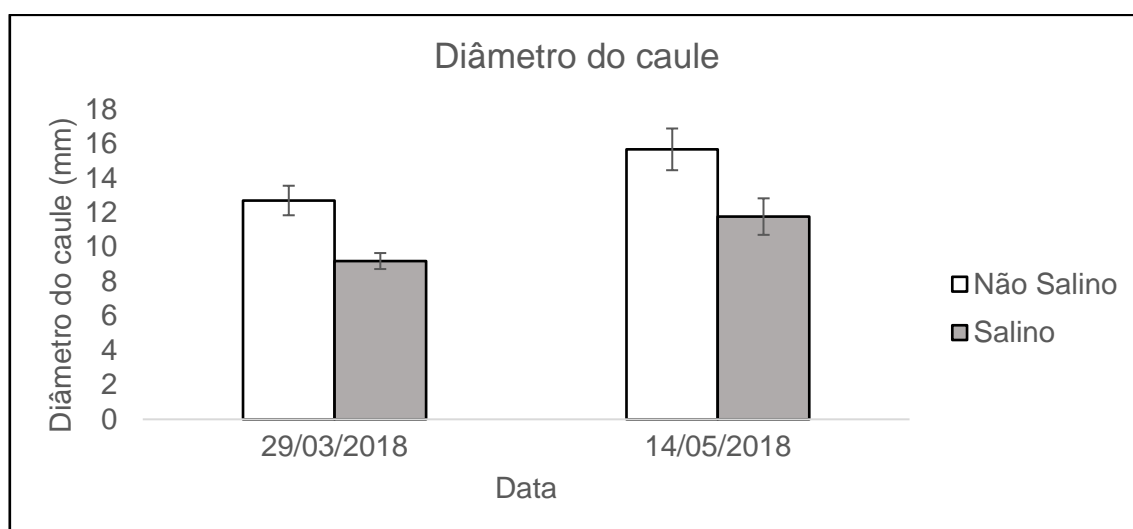


Figura 15 - Valores de diâmetro do caule medido ao nível do solo, registados a meio e no final do ciclo cultural. Os valores representam médias \pm erro padrão $n=20$.

4.1.4. Biomassa

No final do ensaio, foi contabilizada a massa fresca e massa seca de todas as plantas de brocolini com vista a comparar as diferenças de biomassa entre as várias modalidades. Neste caso apenas foi quantificada a biomassa correspondente às folhas e caules, uma vez que os rebentos de brocolini foram colhidos e pesados separadamente ao longo de sucessivas semanas em que decorreu a fase produtiva.

Constatou-se que o stress salino provocou um decréscimo na quantidade de massa fresca e seca comparado com a das plantas em solo não salino (Quadro 13), tal como observado por Bacarin *et al.* (2011), Siddiqui *et al.* (2009), Rasheed *et al.* (2012) e Ashraf, (2009). Por outro lado, a média do conteúdo de água dos tecidos é significativamente superior nas plantas sujeitas a stress salino, uma vez que apresentam uma menor percentagem de matéria seca em relação aos brocolinis produzidos em solo sem sal. Este resultado demonstra que as plantas em stress conseguiram manter um teor de água mais elevado nas folhas e caule, constituindo um indicativo de que os brocolinis têm mecanismos de adaptação ao stress salino relacionados com o ajustamento osmótico.

Contrariamente a estes resultados, Lu *et al.* (2003) não obtiveram diferenças no conteúdo de água dos tecidos no estudo realizado com plantas de *Suaeda salsa* e Ghuge *et al.* (2011) verificaram valores opostos em *Brassica juncea* L., com as plantas em stress a surgirem com teores de água dos tecidos inferiores ao das plantas controlo. Estes resultados aparentemente contraditórios podem ser devidos ao facto de haver uma resposta temporal oposta. Um aumento na salinidade do solo causa uma perda de água pelas células, mas essa perda de volume celular e da turgescência é transitória. Em poucas horas, as células podem recuperar o volume e turgescência original devido ao ajustamento osmótico (Munns & Tester, 2008).

O valor máximo registado do conteúdo de água dos tecidos foi de 82,67%, encontrando-se abaixo do mencionado por Tadeo (2000) e Azcón-Bieto & Talón (2000), que referem um conteúdo em água das plantas herbáceas em geral próximo dos 90%.

Quadro 13 - Valores médios de massa fresca, massa seca, percentagem de matéria seca e conteúdo em água dos tecidos nas plantas de brocolini. Em cada coluna, as modalidades assinaladas com a mesma letra não diferem significativamente ($\alpha=0,05$).

Salinidade	Massa fresca (g)	Massa Seca (g)	Matéria seca (%)	Conteúdo em água dos tecidos (%)
Não Salino	332,7 a	74,8 a	22,5 a	77,5 b
Salino	249,2 b	43,1 b	17,3 b	82,7 a

Para além da influência da salinidade ao nível dos diversos parâmetros relacionados com a biomassa, a análise estatística também demonstra influencia dos bioestimulantes em algumas das medições. Apesar de nenhum bioestimulante ter diferido significativamente da testemunha na quantidade de massa fresca, verificam-se diferenças nas médias entre os diversos produtos aplicados, com destaque para as duas algas que proporcionaram os valores mais elevados (Quadro 14). Contrariamente, ao nível da massa seca, não existiu influencia dos bioestimulantes, pelo que, nenhum valor diferiu significativamente da testemunha e entre si.

Na análise de variância realizada nos valores do conteúdo de água dos tecidos para os diferentes bioestimulantes aplicados, verifica-se que o *p-value* se encontra superior ao valor definido de $\alpha=0,05$ (*p-value*=0,0567). Apesar de ser superior, encontra-se no limiar, pelo que será sensato observar as diferenças das médias entre as diversas modalidades. Verifica-se que a média do conteúdo de água dos tecidos referente ao tratamento com ácido poliglutâmico é o único que difere significativamente dos restantes, tendo a média mais baixa de todas.

A ANOVA demonstrou que não existiu interação entre os bioestimulantes e a salinidade em nenhum dos parâmetros relacionados com a biomassa.

Quadro 14 - Valores médios de massa fresca, massa seca, percentagem de matéria seca e conteúdo em água dos tecidos nas plantas de brocolini sujeitas a diferentes tratamentos com bioestimulantes. Em cada coluna, as modalidades assinaladas com a mesma letra não diferem significativamente ($\alpha=0,05$).

Bioestimulante	Massa fresca (g)	Massa Seca (g)	Matéria seca (%)	Conteúdo em água dos tecidos (%)
Testemunha	290,2 <i>abc</i>	58,8 <i>a</i>	19,8 <i>b</i>	80,3 <i>a</i>
Glicina betaína	285,9 <i>bc</i>	58,5 <i>a</i>	20,1 <i>ab</i>	79,9 <i>ab</i>
Ácido poliglutâmico	270,9 <i>c</i>	57,4 <i>a</i>	20,8 <i>a</i>	79,3 <i>b</i>
<i>Ecklonia maxima</i>	309,5 <i>a</i>	60,5 <i>a</i>	19,3 <i>b</i>	80,7 <i>a</i>
<i>Scenedesmus</i> sp.	298,3 <i>ab</i>	59,5 <i>a</i>	19,7 <i>b</i>	80,3 <i>a</i>

O quadro 15 mostra que os valores médios dos tratamentos com a glicina betaína e ácido poliglutâmico são estatisticamente diferentes dos restantes e têm um efeito regulador na biomassa dos tecidos, uma vez que estes compostos contribuem para a produção de osmorreguladores como aminoácidos e açúcares. Ou seja, como estes compostos existem em maior quantidade nas plantas em stress (Ghughe *et al.*, 2011), provocam um aumento na quantidade de matéria seca das mesmas.

Quadro 15 - Valores médios da razão massa fresca/massa seca para os diferentes tratamentos em estudo. Em cada coluna, as modalidades assinaladas com a mesma letra não diferem significativamente ($\alpha=0,05$).

Bioestimulante	Razão Massa fresca/Massa seca
Testemunha	5,2 <i>a</i>
Glicina betaína	5,1 <i>ab</i>
Ácido poliglutâmico	4,9 <i>b</i>
<i>Ecklonia maxima</i>	5,3 <i>a</i>
<i>Scenedesmus</i> sp.	5,2 <i>a</i>

4.1.5. Produção do brocolini no ensaio em vasos

Para além do menor crescimento das plantas de brocolini causado pela adição de NaCl, também foi possível observar um decréscimo ao nível da biomassa produtiva, isto é, da parte da planta com interesse comercial, denominados rebentos. Pela análise de variância verifica-se que o total da produção (somatório de 14 colheitas) é influenciado pela salinidade, onde a série de plantas em stress salino apresentam claramente uma produtividade inferior (Quadro 16). Analisando a variância colheita a colheita observa-se o impacto da salinidade, do fator tempo/data (número de colheita), bem como da interação entre eles.

Quadro 16 - Valores médios da produção do brocolini em cada colheita e somatório total por planta, em meio salino e não salino. Em cada coluna, as modalidades assinaladas com a mesma letra não diferem significativamente ($\alpha=0,05$).

Salinidade	Produção média por colheita (g)	Produção média total por planta (g)
Não salino	15,7 <i>a</i>	220,1 <i>a</i>
Salino	11,8 <i>b</i>	164,8 <i>b</i>

A produção dos brocolinis sujeitos a stress salino é aproximadamente 25% inferior aos produzidos em solo sem sal. Na figura 16 é possível observar a produção dos rebentos de brocolini acumulada ao longo das sucessivas colheitas. Nota-se uma clara diferença entre as duas séries de salinidade, complementando assim a informação do quadro anterior.

Apesar de estatisticamente não existir efeito dos bioestimulantes ao nível das colheitas individuais, nem no total da produção no final do ciclo, é importante notar uma ligeira diferença nas médias da produção total correspondentes aos diferentes bioestimulantes aplicados (Figura 17). Na série de plantas produzidas em solo sem adição de NaCl verifica-se que o tratamento com PGA foi superior aos restantes, mas a diferença é insignificante em relação à testemunha, menos de 2,5 %. Na série salina, os tratamentos com algas foram os que apresentaram médias de produção superiores, com a *Ecklonia maxima* a obter uma média superior em 5% e a microalga *Scenedesmus obliquus* em 6,3 % em relação à testemunha.

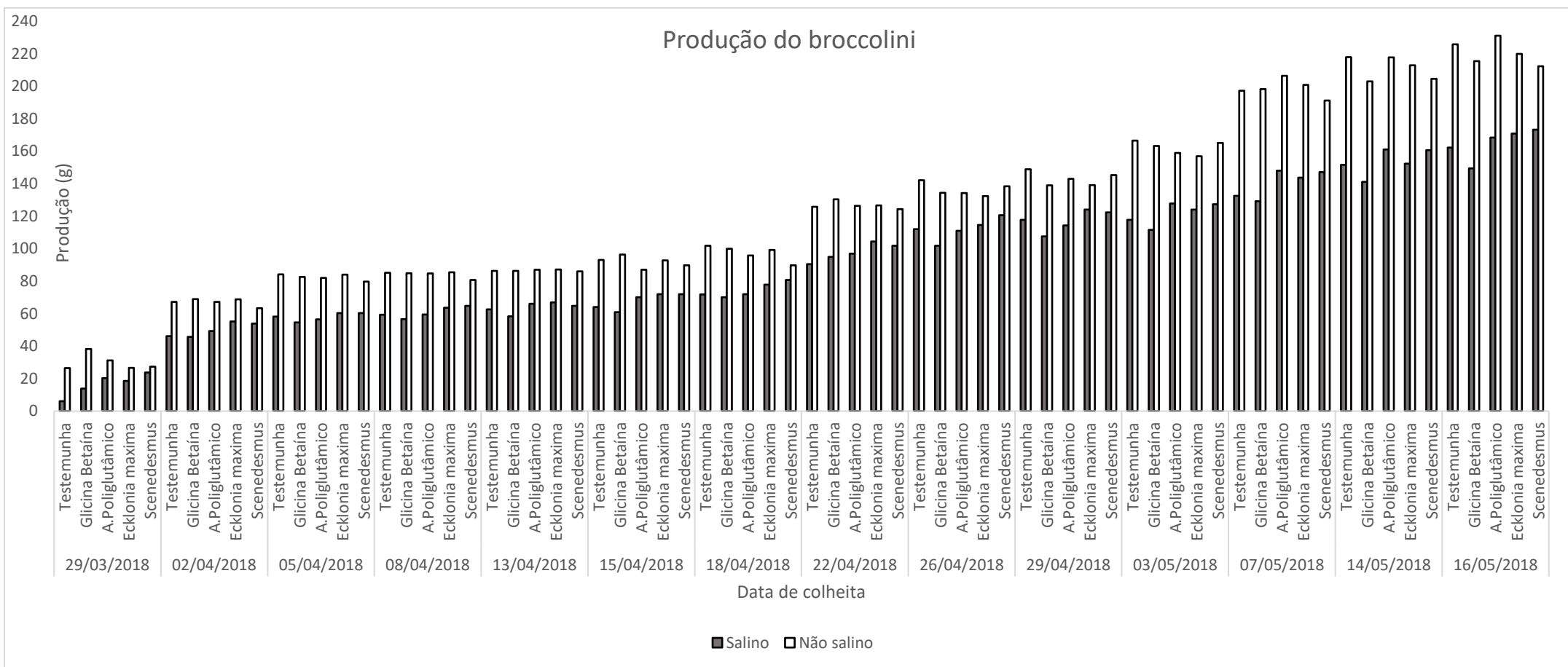


Figura 16 - Produção média por planta de brocolini nas diferentes modalidades em estudo. Os valores representam as médias acumuladas ao longo das sucessivas colheitas.

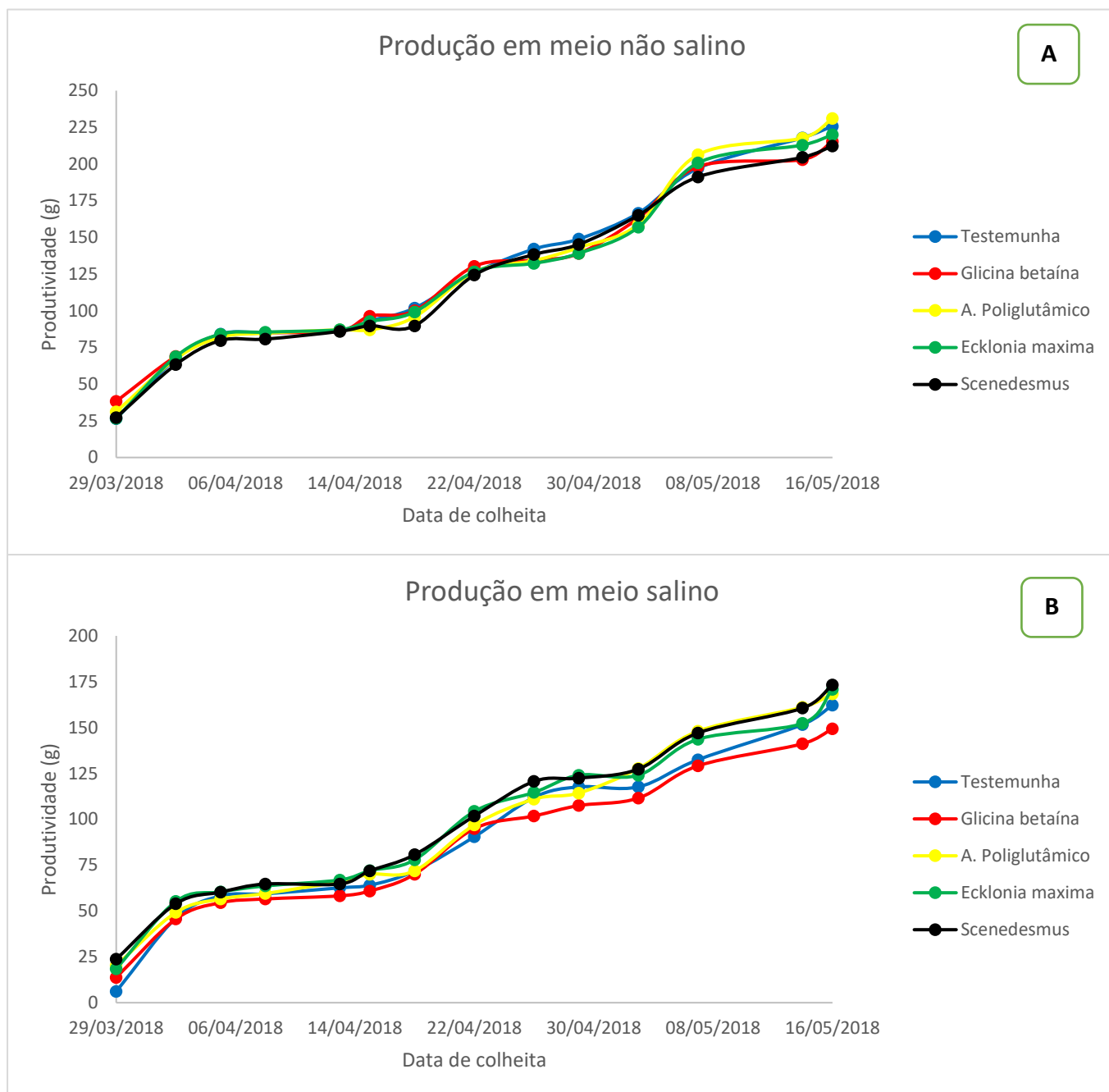


Figura 17 - Evolução da produção média por planta de brocolini nas diferentes modalidades em estudo. Os valores representam as médias acumuladas ao longo das sucessivas colheitas. [A] produção em meio não salino; [B] produção em meio salino.

A análise de variância dos dados correspondente à produção acumulada em cada data de colheita revelou uma interação significativa entre os bioestimulantes e a salinidade (Figura 18). O teste de comparação de média demonstrou diferenças significativas sobre a média do peso acumulado em cada colheita, para a série de plantas em stress.

Analysis of Variance Table for Peso acumulado					
Source	DF	SS	MS	F	P
Bioestimulante	4	1796	449	2.14	0.0752
NoColheita	13	1315217	101171	482.05	0.0000
Salinidade	1	136091	136091	648.44	0.0000
Bioestimulante*NoColheita	52	3771	73	0.35	1.0000
Bioestimulante*Salinidade	4	5069	1267	6.04	0.0001
NoColheita*Salinidade	13	29375	2260	10.77	0.0000
Bioestimulante*NoColheita*Salinidade	52	1816	35	0.17	1.0000
Error	420	88147	210		
Total	559	1581282			
Grand Mean 108.31 CV 13.38					

Figura 18 - Output estatístico correspondente à análise de variância para o peso acumulado nas várias colheitas.

Os valores da média do peso acumulado dos rebentos de brocolini em cada colheita na série salina, verifica-se que as plantas onde foram aplicadas a macroalga *Ecklonia maxima* e a microalga *Scenedesmus obliquus* são os que apresentam um peso acumulado de rebentos superior aos outros tratamentos (Quadro 17). Um estudo elaborado por Rouphael *et al.* (2017) também resultou num aumento de produtividade e de biomassa em plantas de aboborinha, após aplicações de soluções com a macroalga *Ecklonia maxima*. A aplicação de microalgas como biofertilizantes tem mostrado resultados promissores em variados tipos de plantas como o trigo (Schreiber *et al.*, 2018), a palmeira tamareira (Saadaoui *et al.*, 2018) e o salgueiro (Grzesik *et al.*, 2017).

Quadro 17 - Valores médios do peso dos rebentos de brocolini acumulado em cada colheita, nos diferentes tratamentos em estudo. Em cada coluna, as modalidades assinaladas com a mesma letra não diferem significativamente ($\alpha=0,05$).

Salinidade	Bioestimulante	Peso acumulado (g/planta)
Não Salino	Testemunha	126,3 a
Não Salino	Glicina betaína	124,7 a
Não Salino	Ácido poliglutâmico	123,4 a
Não Salino	<i>Ecklonia maxima</i>	123,8 a
Não Salino	<i>Scenedesmus</i> sp.	121,3 a
Salino	Testemunha	89,5 cd
Salino	Glicina betaína	85,4 d
Salino	Ácido poliglutâmico	94,4 bc
Salino	<i>Ecklonia maxima</i>	96,3 b
Salino	<i>Scenedesmus</i> sp.	98,1 b

O valor acumulado do peso de rebentos obtido na modalidade ácido poliglutâmico, embora um pouco mais baixo, não difere significativamente das duas modalidades acima mencionadas, pelo que poderá também ter impacto na produtividade acumulada em cada colheita dos rebentos face a condições de stress.

Em condições de não salinidade, os bioestimulantes não apresentaram qualquer efeito sobre a produtividade média acumulada em cada colheita das plantas de broccolini.

Com os valores obtidos foi possível calcular o índice de colheita. Este índice pode ser obtido através do quociente entre a biomassa útil (peso dos rebentos) e a biomassa total no final do ciclo, ou seja, é a divisão do peso dos rebentos pelo peso da biomassa total no fim do ciclo.

Pelos resultados do quadro 18, pode-se constatar que os valores do índice de colheita não diferem significativamente entre as duas séries, apesar dos valores de biomassa da série salina serem bastante inferiores. Com isto, é possível perceber que apesar do stress induzido, os broccolinis produzem uma quantidade de rebentos proporcional à sua biomassa.

Quadro 18 - Somatório das massas vegetais quantificadas para as duas séries (não salina e salina) e respetivo índice de colheita. Em cada coluna, as modalidades assinaladas com a mesma letra não diferem significativamente ($\alpha=0,05$).

Salinidade	Massa rebentos (g)	Massa fresca (g)	Biomassa total (g)	Índice de colheita (%)
Não salino	220,1 a	332,7 a	552,8 a	39,8 a
Salino	164,8 b	249,2 b	414,0 b	39,8 a

Quanto ao valor do índice de colheita, este significa que aproximadamente 40% do total de massa vegetal, produzida pelos broccolinis ao longo de todo o ciclo, corresponde aos rebentos, ou seja, a produção. É um valor aproximado ao do brócolo convencional, referido no estudo de Thirupal *et al.* (2014).

Na biomassa total das plantas nos diferentes tratamentos com bioestimulantes, observa-se que nenhum dos produtos difere significativamente da testemunha, apesar da alga *Ecklonia maxima* apresentar uma média ligeiramente superior às restantes modalidades. Em relação ao índice de colheita, todos os tratamentos apresentam resultados médios que não diferem entre si (Quadro 19).

Quadro 19 - Somatório das massas vegetais quantificadas para os diferentes tratamentos e respetivo índice de colheita. Em cada coluna, as modalidades assinaladas com a mesma letra não diferem significativamente ($\alpha=0,05$).

Bioestimulante	Massa rebentos (g)	Massa fresca (g)	Biomassa total (g)	Índice de colheita (%)
Testemunha	194,0 <i>a</i>	290,2 <i>abc</i>	484,2 <i>ab</i>	40,0% <i>a</i>
Glicina betaína	182,9 <i>a</i>	285,9 <i>bc</i>	468,9 <i>b</i>	38,6% <i>a</i>
Ácido poliglutâmico	197,3 <i>a</i>	270,9 <i>c</i>	468,2 <i>b</i>	41,9% <i>a</i>
<i>Ecklonia maxima</i>	195,4 <i>a</i>	309,5 <i>a</i>	504,9 <i>a</i>	38,8% <i>a</i>
<i>Scenedesmus</i> sp.	192,8 <i>a</i>	298,3 <i>ab</i>	491,1 <i>ab</i>	39,3% <i>a</i>



Figura 19 - Comparação entre as plantas de brocolini sem stress e com stress salino. Plantas com os rebentos prontos a serem colhidos. Fotografia registada na 10ª semana do ciclo [A]. Rebento de brocolini com o comprimento adequado para ser colhido (10-18 cm) [B].

4.1.6. Desenvolvimento radicular

No fim do ensaio foi analisado visualmente e registado em fotografia o crescimento radicular de uma amostra de plantas correspondente a cada uma das modalidades, a fim de verificar o efeito dos bioestimulantes ao nível da expansão das raízes.

Na figura 20 [A] é possível observar parte do sistema radicular das plantas cultivadas em solo sem sal. Uma breve análise, permite ter a percepção que as plantas com os números 6 e 15 apresentam uma dimensão radicular confinada no fundo do vaso, superior às plantas das restantes modalidades. Os referidos números correspondem a tratamento com glicina betaína e *Ecklonia maxima*, respetivamente.

Por sua vez, no caso da amostra de plantas em solo salinizada com NaCl, os broccolinis com o número 21 e 35 são os que dão uma percepção de maior volume radicular, e são respetivamente a testemunha e o tratamento com *Ecklonia maxima* (Figura 20 [B]).

Apesar de esta avaliação ser meramente qualitativa, dado que não foram realizadas análises concretas neste âmbito, as observações estão de acordo com os resultados de Aremu *et al.* (2015), que indicam um aumento do desenvolvimento radicular provocado pela aplicação de *Ecklonia maxima* em plantas da família *Asparagaceae*. O mesmo efeito é anunciado pelo fabricante do produto que contem esta alga, utilizado no ensaio.



Figura 20 - Aglomerados radiculares de uma amostra de plantas cultivadas em solo sem a adição de NaCl [A] e com a adição de NaCl [B]. Cada número corresponde a uma modalidade dos diversos tratamentos em estudo (da esquerda para a direita: testemunha; glicina betaína; ácido poliglutâmico; *Ecklonia maxima*; *Scenedesmus sp.*).

4.1.7. Parâmetros fisiológicos, fotossintéticos e estado da planta

4.1.7.1. Clorofila nas folhas

A avaliação da clorofila presente nas folhas de broccolinis foi obtida através da medição com o aparelho Minolta SPAD 502. A avaliação foi realizada nas folhas mais novas e mais velhas das plantas nas primeiras semanas do ciclo, e nas folhas completamente expandidas ao longo de todo o ciclo. Os resultados médios podem ver observados nas figuras 21, 22 e 23 e no quadro 20. A análise de variância demonstrou influencia da interação entre a salinidade e semana nos resultados da leitura SPAD/clorofila nas folhas jovens e nas folhas expandidas. Nas folhas velhas existiu interação salinidade*semana e interação bioestimulante*salinidade.

As leituras SPAD/clorofila mostram uma tendência para o aumento da clorofila nas folhas de broccolinis em stress salino em comparação com as plantas controlo, à exceção das folhas velhas. Estes resultados são contrários aos divulgados por Tian *et al.* (2016), que referem teores de clorofila inferiores nas plantas de trigo em stress salino em relação à testemunha. Estudos realizados em *brassicas* também contrariam os valores obtidos no presente estudo, anunciando uma redução da clorofila nas plantas em meio salino (Mittal *et al.*, 2012, Siddiqui *et al.*, 2009, Rasheed *et al.*, 2012). Contudo, em outras culturas, algumas variedades com elevada tolerância à salinidade apresentam teores de clorofila superiores ao controlo (Munns *et al.*, 2006). Como tal, é possível que exista alguma tolerância do broccolini face a condições de salinidade. Nas folhas mais jovens, os valores de SPAD/clorofila são superiores na série de plantas em stress (Figura 21).

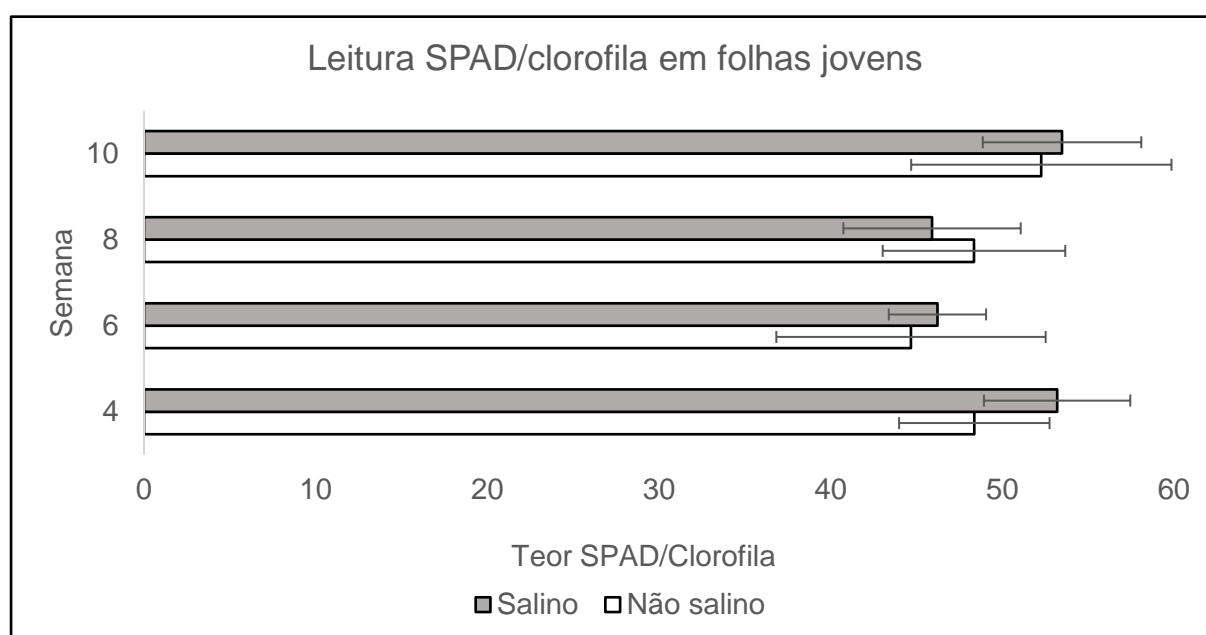


Figura 21 - Valores da leitura SPAD/clorofila nas folhas mais jovens do broccolini, registado nas primeiras semanas do ciclo cultural. Os valores representam médias \pm erro padrão $n=20$.

Como espectável o conteúdo em clorofila é máximo nas folhas completamente expandidas e diminui nas últimas semanas do ciclo de vida da planta quando as folhas entram em fase de senescência ou envelhecimento e ocorre uma diminuição dos pigmentos (Figuras 22 e 23). Para além disso, as medições realizadas nas folhas expandidas mostram que as que chegam à fase de máxima expansão no final do ciclo, apresentam um menor teor de clorofila em comparação com as de meio do ciclo, dada o enfraquecimento da planta no final (Figura 22).

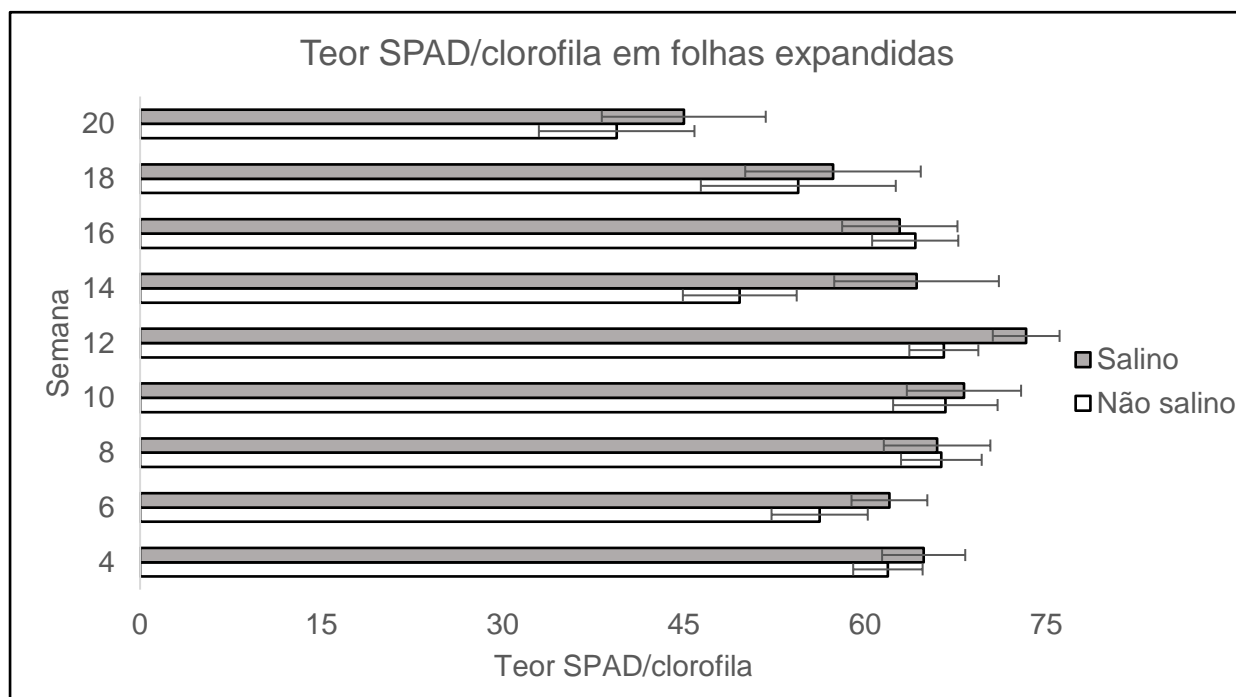


Figura 22 - Valores médios da leitura SPAD/clorofila nas folhas expandidas registados ao longo do ciclo cultural. Os valores representam médias \pm erro padrão $n=20$.

As folhas mais velhas (em cada semana) do broccolini, por já estarem num processo de senescência, são mais sensíveis ao stress salino e foram as únicas a apresentar menos teor de clorofila do que as folhas das plantas testemunha. Esta tendência foi mais acentuada na segunda medição (6ª semana) quando as folhas mais velhas estavam em processo mais avançado de senescência (Quadro 20).

Quadro 20 - Valores médios da leitura SPAD/Clorofila nas folhas mais velhas do broccolini, nas primeiras duas semanas do ciclo cultural. Em cada coluna, as modalidades assinaladas com a mesma letra não diferem significativamente ($\alpha=0,05$).

Salinidade	Semana	SPAD/clorofila
Não salino	4	54,4 a
Não salino	6	52,1 ab
Salino	4	49,8 b
Salino	6	40,1 c

Na figura 23 é visível que nas plantas em stress salino em que foram aplicadas a solução de glicina betaína, o valor médio do SPAD/clorofila em folhas velhas é superior ao dos restantes tratamentos.

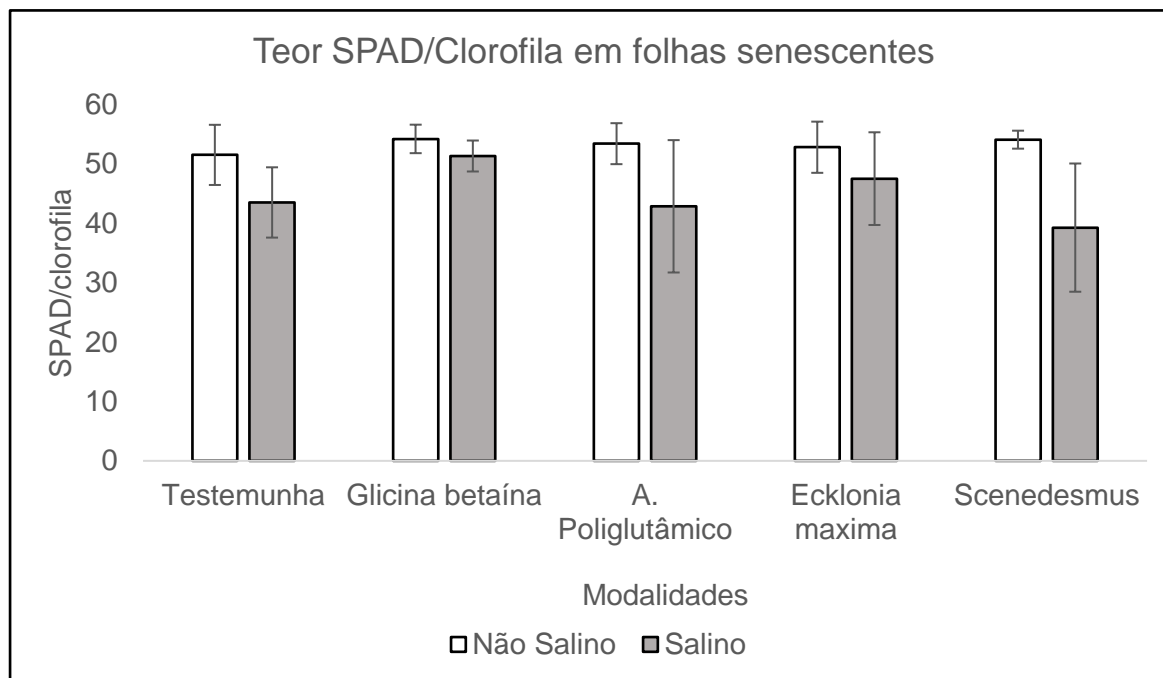


Figura 23 - Valores médios da interação entre salinidade e os bioestimulantes ao nível dos valores de leitura SPAD/Clorofila em folhas senescentes de broccolinis. Os valores representam médias \pm erro padrão n=20.

4.1.7.2. Índice de refletância fotoquímica

Os valores médios do índice de refletância fotoquímica (PRI), avaliado em folhas completamente expandidas, não apresentaram diferenças significativas entre plantas controlo e as em stress salino, à exceção da última medição realizada no fim do ensaio, em que as folhas das plantas sujeitas à salinidade demonstraram valores superiores às folhas das plantas não salinas (Figura 24), visto estas últimas apresentarem sinais visíveis de senescência (Figura 14).

O abaixamento do valor médio de PRI deveu-se ao já referido amarelecimento das folhas dos broccolinis no final do ciclo, que originou perda de clorofila e de outros pigmentos, e consequentemente menores valores de índice de refletância fotoquímica

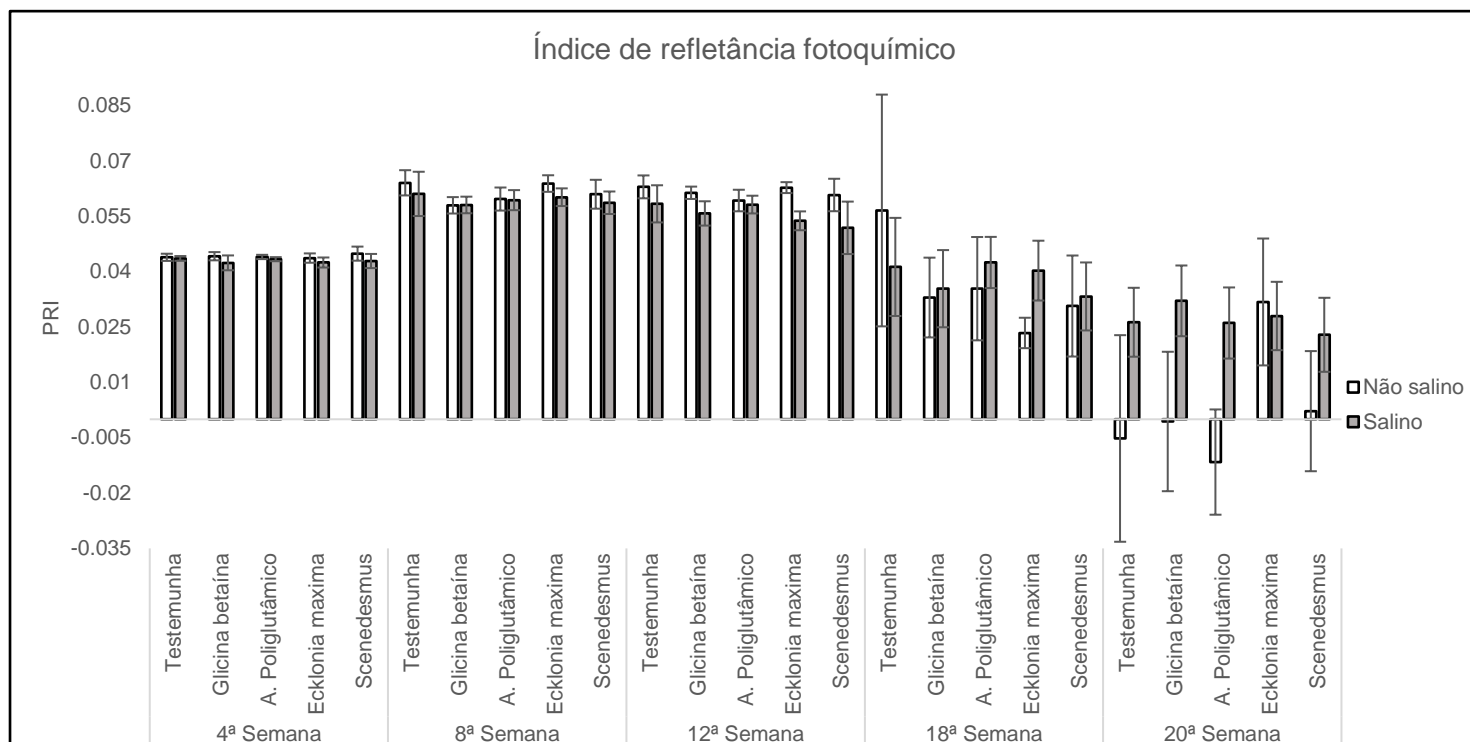


Figura 24 - Valores médios do índice de refletância fotoquímica (PRI) nas folhas expandidas, registrado ao longo do ciclo cultural com o aparelho PlantPen PRI 200 (PSI). Os valores representam médias \pm erro padrão $n=20$.

4.1.7.3. Fluorescência da clorofila

Utilizou-se a fluorescência da clorofila para monitorizar a eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (PSII) de forma a obter informações sobre a integridade e alterações no aparelho fotossintético. A eficiência fotoquímica do PSII é um dos principais parâmetros usados na avaliação de danos do sistema fotossintético, permitindo verificar se as plantas estiveram submetidas a algum nível de stress (Krause & Weis, 1991).

A observação dos resultados permite constatar que não existiram anomalias passíveis de afetar a eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II (F_v/F_m) na fase do ciclo cultural em que foi realizada esta avaliação. O valor médio obtido manteve-se acima de 0,8 para qualquer uma das séries e entre tratamentos (modalidades), valor próximo do máximo obtido em plantas saudáveis (Rosescu & Chitu, 2009), indicando um funcionamento normal dos centros de reação do PSII (Figura 25). Mehta *et al.* (2010) e Lu *et al.* (2003) também não observaram diferenças na razão F_v/F_m nos ensaios de salinidade.

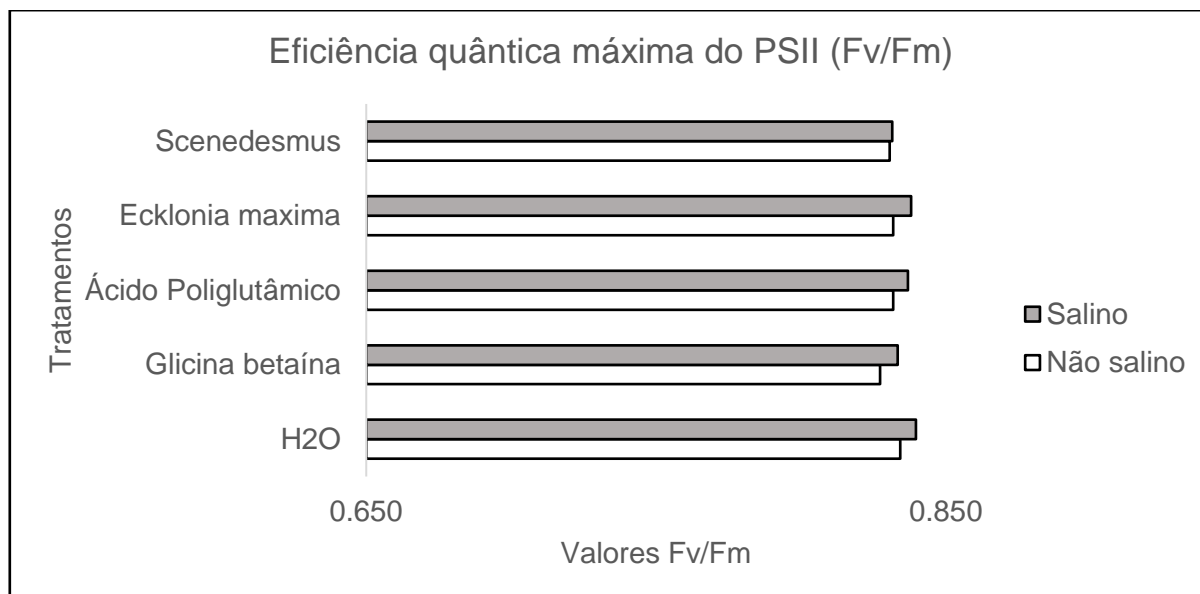


Figura 25 - Valores médios da eficiência quântica máxima do PSII (Fv/Fm) medida em folhas de brocolini expandidas sujeitas a diferentes tratamentos. Os valores representam médias \pm erro padrão $n=20$.

Apesar das médias serem muito semelhantes entre modalidades, indicando que se trata de um parâmetro pouco sensível, a análise de variância demonstrou que os valores médios de Fv/Fm da série de plantas em meio salino são significativamente superiores à da série não salina.

Pelos resultados obtidos parece que a eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II das plantas de brocolini não é atingida negativamente pela salinidade, havendo mesmo um ligeiro aumento dos pigmentos fotossintéticos e da fotossíntese quando as plantas se desenvolvem num meio com elevada concentração de NaCl.

4.1.7.4. Índice de desempenho

Foi avaliado outro parâmetro relacionado com a fotossíntese, denominado índice de desempenho ou *Performance Index* (PI). Este parâmetro caracteriza a vitalidade da planta, reflete a funcionalidade do fotossistema I e II e transmite uma informação quantitativa referente ao desempenho da planta no momento da medição (Strasser *et al.*, 2004).

O índice de desempenho (PI) apresenta valores mais elevados em folhas das plantas em salinidade do que as do controlo, mostrando diferenças entre os dois tratamentos (Figura 26). Já em ensaios anteriores o PI mostrou tendência para aumentar em condições de stress hídrico moderado, decrescendo acentuadamente em stress intenso (Silvestre *et al.*, 2014).

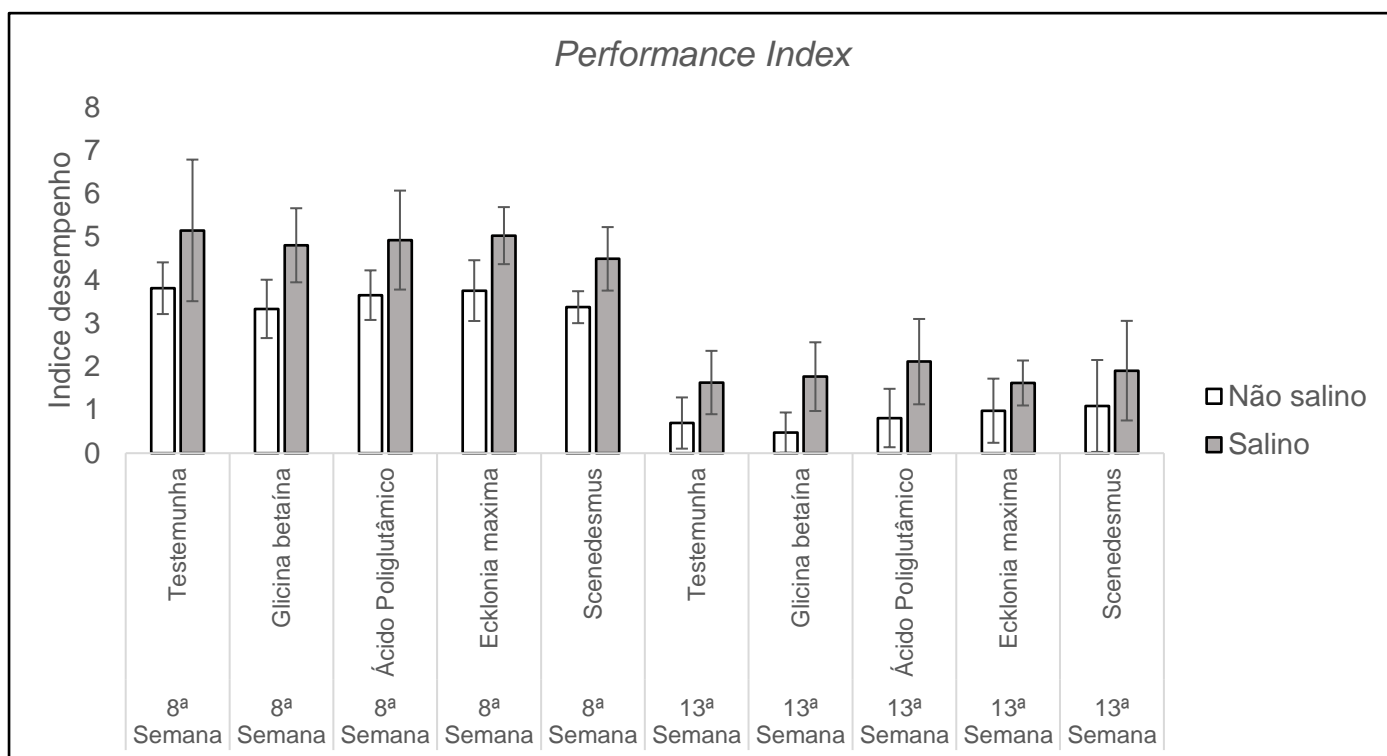


Figura 26 - Índice de desempenho fotossintético dos broccolinis sujeitos a diversos tratamentos com bioestimulantes, na 8ª e 13ª semanas do ciclo cultural. Os valores representam médias \pm erro padrão $n=20$.

Uma vez que as plantas sujeitas à salinidade apresentam um menor crescimento em resposta ao stresse salino e como a *performance* fotossintética parece não estar inibida, os fotoassimilados produzidos podem estar a ser utilizados em mecanismos de tolerância ao stresse como a produção de osmorreguladores (prolina, açúcares e proteínas do tipo chaperonas) (Viegas *et al.*, 2001; Filippou *et al.*, 2013; Nouri & Komatsu, 2013), não sendo usados para o crescimento e produtividade da planta.

Um ponto a ter em atenção é o facto de na segunda medição, realizada na 13ª semana do ciclo, o intervalo de valores resultantes decresceu para mais de metade face à primeira medição, visto que as plantas estavam próximas da última fase do ciclo, onde consequentemente existe um decréscimo no desempenho fotossintético devido à intensificação da senescência da planta. Para além disso ocorreu uma acentuação da diferença entre a série de plantas salina e não salina para todos os tratamentos em estudo.

Estatisticamente ocorreu influencia do fator salinidade e do fator semana (tempo) na média do índice de desempenho.

4.1.8. Características do solo no fim do ensaio em vasos

Tanto o pH como a condutividade elétrica (CE) foram influenciados pelo fator salinidade, tal como demonstra a análise de variância (ANOVA). O valor de CE para o solo salino era expectável, uma vez que na salinização, ao adicionar uma certa quantidade de sais, consequentemente a condutividade elétrica aumenta (Quadro 21). Por outro lado, os resultados demonstram que a CE do solo não salino reduziu em relação ao resultado da análise sumária antes de ser instalado o ensaio (210 $\mu\text{S}/\text{cm}$), sendo o intervalo de valores muito semelhante para todas estas modalidades. Esta redução foi provocada pelo consumo de sais pelas plantas, dado que, provavelmente, as necessidades foram superiores às quantidades de sais disponibilizados aquando das diversas fertilizações.

No que diz respeito ao pH (H_2O), em geral os valores subiram em relação ao resultado da análise inicial (6,6). Este incremento deveu-se provavelmente aos fertilizantes aplicados e não à aplicação dos bioestimulantes, uma vez que os valores do potencial hidrogeniónico apresentam uma amplitude muito reduzida entre repetições, e a aplicação por ser foliar, provavelmente não afetou o pH do solo. Contudo ocorreu um aumento significativo no solo salino em relação ao solo padrão, como anteriormente descrito por Nawaz *et al.* (2010), devido ao caráter alcalino do cloreto de sódio.

Quadro 21 - Valores médios de pH e condutividade elétrica para cada uma das séries de salinidade. Em cada coluna, as modalidades assinaladas com a mesma letra não diferem significativamente ($\alpha=0,05$).

Salinidade	pH	Condutividade elétrica ($\mu\text{S}/\text{cm}$)
Não salino	7,2 <i>b</i>	118,4 <i>b</i>
Salino	7,5 <i>a</i>	552,9 <i>a</i>

Os bioestimulante e a sua interação com a salinidade não influenciaram os resultados de condutividade elétrica e pH do solo, apesar da ANOVA apresentar *p-values* muito próximos do limiar $\alpha=0,05$, para os referidos fatores.

4.2. Ensaio em campo comercial

4.2.1. Produção do broccolini

A análise de variância demonstrou influência do fator data (tempo) nos resultados da produtividade dos broccolinis ensaiados em campo, isto é, a produtividade está dependente da fase reprodutiva em que a planta se encontra no tempo e também se foi executada alguma colheita nos dias anteriores. Neste caso, destaca-se a segunda data de colheita, em que existiu um pico de produção devido a ter sido colhido a totalidade da inflorescência principal, que na maioria dos casos representa a parte mais produtiva da planta.

Por outro lado, não existiu influência dos bioestimulantes, mas resultaram pequenas diferenças na média entre as modalidades estudadas, apesar de nenhuma ser significativamente diferente da testemunha. Destacam-se as plantas tratadas com ácido poliglutâmico que apresentaram um valor médio de massa de rebentos 8,5% superior à testemunha, seguindo-se o tratamento com *Ecklonia maxima* com uma média produtiva 1% superior à modalidade de controlo (Quadro 22). O tratamento com glicina betaína foi o que suscitou uma produtividade média mais baixa, acentuando-se uma quebra de produção a partir de meio do período de colheita (Figura 27).

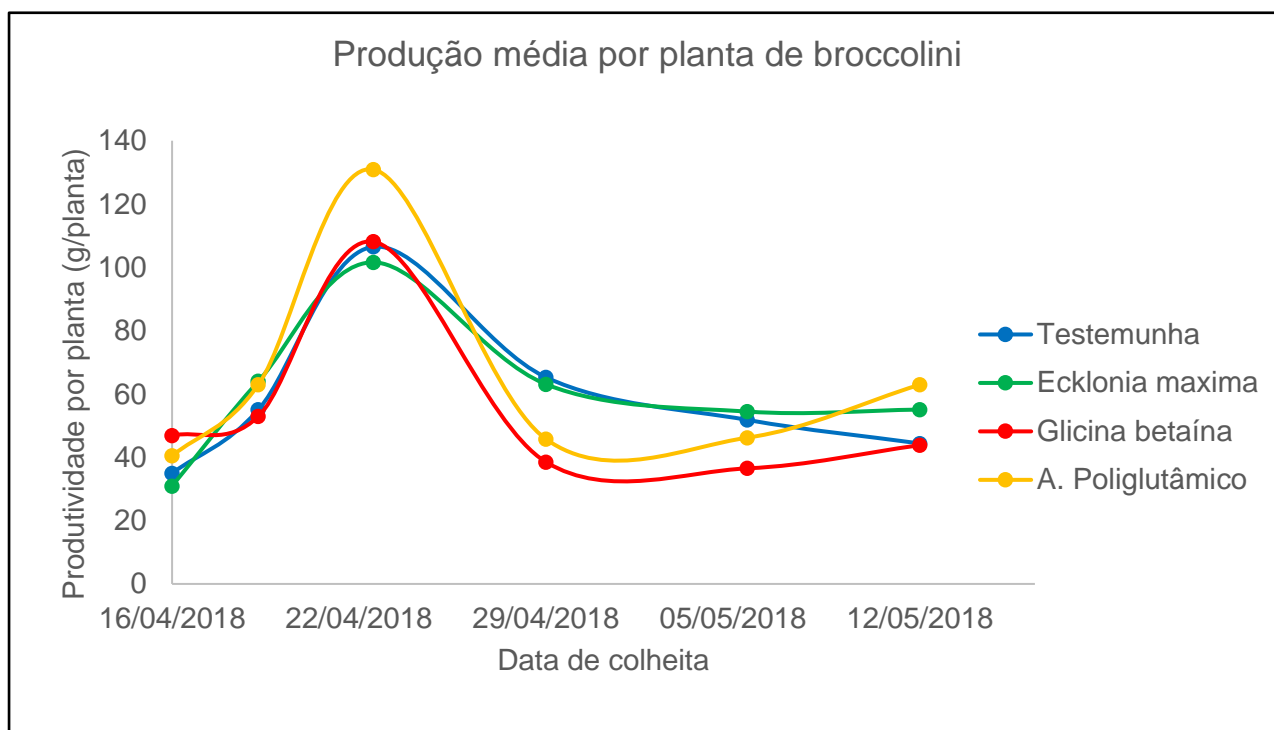


Figura 27 - Evolução da produção do broccolini ensaiado em campo comercial, nos diferentes tratamentos ao longo das várias colheitas.

Quadro 22 - Valores médios da massa de rebentos por planta, em gramas, no total das colheitas dos broccolinis no ensaio de campo comercial. As modalidades assinaladas com a mesma letra não diferem significativamente ($\alpha=0,05$).

Bioestimulante	Produção média por planta (g)
Testemunha	209,1 <i>ab</i>
Glicina betaína	201,7 <i>b</i>
Ácido poliglutâmico	228,9 <i>a</i>
<i>Ecklonia maxima</i>	210,8 <i>ab</i>

4.2.2. Conservação pós-colheita

Em termos de conservação, era esperado que o produto aplicado à base de glicina betaína seria o que iria potenciar o prolongamento da vida útil da produção pós-colheita, ao reduzir a desidratação. Contudo, o ensaio realizado em câmara de frio a 7°C às escuras durante 2 meses demonstrou que nenhum dos produtos em estudo apresentou capacidade de prolongar a conservação do broccolini, visto que todos eles, se mantiveram semelhantes em termos de aspeto e de perda de massa semanal derivado da desidratação. No início do teste de conservação, foram colocadas aproximadamente 300 g de broccolinis tratados no campo com cada um dos produtos comerciais em estudo. Ao fim dos 60 dias, as amostras apresentavam cerca de 140 g cada uma.

O produto deixou de ter qualidade para ser comercializado a partir do 14º dia, mantendo-se as amostras muito semelhantes, apesar dos diferentes tratamentos no campo a que foram sujeitas. A percentagem de redução de peso devido à desidratação, do início para o fim do período de conservação, foi próxima de 45% em todos os tratamentos em estudo, pelo que é possível considerar que nenhum produto apresentou capacidade para prolongar a vida útil dos broccolinis em pós-colheita (Quadro 23).

Quadro 23 - Percentagem de redução de peso do dia 0 para o dia 60, nas diferentes modalidades.

Bioestimulante	Redução de peso (%)
Testemunha	45,2
Glicina betaína	45,4
Ácido poliglutâmico	46,1
<i>Ecklonia maxima</i>	44,9



Figura 28 - Fotografias dos rebentos de brocolini ao longo do processo de conservação. 1 - dia 0; 2 - 7º dia; 3 - 30º dia e 4 - 60º dia. Glicina betaína [A], *Ecklonia maxima* [B], Testemunha [C], Ácido poliglutâmico [D].



5. Conclusões

No ensaio realizado em vasos verificou-se que a salinidade afetou os parâmetros de desenvolvimento e crescimento do brocolini, tendo ainda uma influência negativa na produção de rebentos. O stress salino causado pela adição de cloreto de sódio ao solo provocou uma redução no número de folhas, e na altura e diâmetro das plantas. Além disso suscitou uma redução da biomassa, mas não houve agravamento dos sintomas de senescência nas folhas mais velhas. Por outro lado, as plantas em condições de salinidade apresentar um maior teor em água nos tecidos, devido provavelmente, a um mecanismo de defesa relacionado com a regulação osmótica. O índice de colheita foi semelhante para as plantas controlo e em salinidade sendo possível concluir que apesar do stress induzido, os brocolinis produzem uma quantidade de rebentos proporcional à sua biomassa. Contudo a massa de rebentos produzida pelas plantas em condições salinas apresenta um decréscimo de 25% em relação ao controlo.

Na avaliação dos parâmetros fisiológicos e fotossintéticos, a salinidade levou a um aumento da clorofila nas folhas mais jovens e nas folhas expandidas do brocolini. Por outro lado, nas folhas mais velhas o stress provocou um decréscimo da clorofila devido a estas se encontrarem em senescência. Na medição da fluorescência da clorofila (F_v/F_m), os resultados demonstram que não existiram anomalias capazes de afetar a eficiência fotoquímica máxima do fotossistema II, o que leva a crer que a fase luminosa da fotossíntese no brocolini não é atingida negativamente pela salinidade. Resultados semelhantes foram obtidos nas medições do índice de desempenho fotossintético (*Performance Index*), em que as plantas em meio salino apresentaram valores ligeiramente superiores ao controlo.

Quanto à aplicação dos bioestimulantes, em termos produtivos, a aplicação do bioestimulante contendo a macroalga *Ecklonia maxima* e o extrato da microalga *Scenedesmus obliquus* apresentaram valores significativamente superiores às restantes modalidades no peso acumulado em cada colheita. As plantas em stress salino tratadas com glicina betaína apresentaram valores médios de clorofila e refletância fotoquímica superiores aos restantes tratamentos nas folhas mais velhas e nas plantas em fim de ciclo, indicando possíveis funções de proteção foliar ao stress.

No estudo realizado em campo comercial, a aplicação de bioestimulantes não provocou um aumento significativo da produção, apesar das médias de peso dos rebentos

das plantas tratadas com ácido poliglutâmico e com a macroalga *Ecklonia maxima* serem ligeiramente superiores às restantes modalidades. A conservação pós-colheita não foi melhorada por nenhum dos produtos aplicados.

Em suma, a salinidade reduz claramente o desenvolvimento e a produção do brocolini. Contudo, esta planta parece apresentar alguma tolerância ao stress salino, visto que, executa uma regulação osmótica de modo a manter uma maior quantidade de água nos tecidos, o que faz com que entre em senescência mais tarde. A fotossíntese parece não ser afetada, podendo estar os fotoassimilados a serem usados em mecanismos de tolerância ao stress, como por exemplo, a produção de osmorreguladores, ao invés de serem usados no desenvolvimento e produtividade da cultura.

Da aplicação dos diferentes bioestimulantes pode concluir-se que em geral os efeitos foram pouco significativos. Relativamente à aplicação do bioestimulante contendo uma macroalga e o extrato de *Scenedesmus obliquus* resultaram valores médios de produção mais elevados, talvez devido ao facto das algas serem organismos ricos em diversos nutrientes, vitaminas e hormonas vegetais, havendo assim maior capacidade para estimular as plantas, comparando com os outros bioestimulantes que contêm na sua formulação compostos mais específicos.

Seria interessante no futuro, estudar a aplicação destes bioestimulantes em plantas sujeitas a outros níveis de salinidade, bem como, diferentes formas de aplicação dos produtos, podendo surgir efeitos mais pronunciados dos bioestimulantes utilizados. Seria particularmente interessante elaborar novos estudos com a microalga *Scenedesmus obliquus*, dado o seu potencial para a utilização na agricultura.

6. Referências bibliográficas

- Abdelkhalek, E., Mohamed, B., Mohammed, A. & Lotfi, A. (2016). Growth performance and biochemical composition of nineteen microalgae collected from different Moroccan reservoirs. *Mediterranean Marine Sci.* 17: 323-332.
- Agboma, P., Jones, M., Peltonen-Sainio, P., Hinkkanen, R. & Pehu, E. (1997). Exogenous glycine betaine enhances grain yield of maize, sorghum and wheat grown under two supplementary watering regimes. *J. of Agronomy and Crop Sci.* 178: 29-37.
- Aguirrezabal, L., Bouchier-Combaud, S., Radziejwoski, A., Dauzat, M., Cookson, S. & Granier, C. (2006). Plasticity to soil water deficit in *Arabidopsis thaliana*: Dissection of leaf development into underlying growth dynamic and cellular variables reveals invisible phenotypes. *Plant, Cell and Environ.* 29: 2216-2227.
- Akins, S., Romanchik-Cerpovicz, J. & Cerpovicz, P. (2016). Broccolini, a Hybrid of Broccoli and Kai-lan, as Compared to Broccoli: An Analysis of Vitamin C Content and Consumer Acceptability. *J. of the Academy of Nutrition and Dietetics* - Suppl 1 - Abstracts Volume 116, Number 9.
- Al-Shehbaz (2012). A generic and tribal synopsis of the *brassicaceae* (*cruciferae*). *Taxon* vol. 61: 931-954.
- Allakhverdiev, S., Sakamoto, A., Nishiyama, Y., Inaba, M. & Murata, N. (2000). Ionic and osmotic effects of NaCl-induced inactivation of photosystem I and II in *Synechococcus* sp. *Plant Physiol.* 123: 1047-1056.
- Allard, F., Houde, M., Krol, M., Ivanov, A., Huner, N. & Sarhan, F. (1998). Betaine improves freezing tolerance in wheat. *Plant Cell Physiol.* 39: 1194-1202.
- Anderson, J., Badruzsaufari, E., Schenk, P., Manners, J., Desmond, O., Ehlert, C., Maclean, D., Ebert, P. & Kazan, K. (2004). Antagonistic interaction between abscisic acid and jasmonate-ethylene signaling pathways modulates defense gene expression and disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 3460-3479.
- Aremu, A. O., Masondo, N. A., Rengasamy, K. R., Amoo, S. O., Jirří Gruz, J., Břba, O., Subrtová, M., Pencík, A., Novák, O., Dolezal, K. & Van Staden, J. (2015). Physiological role of phenolic biostimulants isolated from brown seaweed *Ecklonia maxima* on plant growth and development. *Planta* 241: 1313-1324.
- Ashraf, M. (2009). Biotechnological approach of improving plant salt tolerance using antioxidants as markers. *Biotechnol. Advances* 27: 84-93.

Ashraf, M. & Foolad, M. R., (2007). Roles of glycine betaine and proline in improving plantabiotic stress resistance. *Environ. and Exp. Bot.* 59: 206-216.

Ashraf, M. & Harris, P. J. C. (2004). Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Sci.* 166: 3-16.

Atkinson, N. J., Lilley, C. J. & Urwin, P. E. (2013). Identification of genes involved in the response of *Arabidopsis* to simultaneous biotic and abiotic stresses. *Plant Physiol.* 162: 2028-2041.

Azcón-Bieto, J. & Talón, M. (2000). Fundamentos de Fisiología Vegetal. Edicions Universitat de Barcelona, Barcelona: 522pp.

Bacarin, M., Deuner, S., Silva, S., Cassol, D. & Silva, D. (2011). Chlorophyll a fluorescence as indicative of the salt stress on *Brassica napus* L. *Braz. J. Plant Physiol.* 23: 245-253.

Banu, M., Hoque, M., Watanabe-Sugimoto, M., Matsuoka, K., Nakamura, Y., Shimoishi, Y. & Murata, Y. (2009). Proline and glycinebetaine induce antioxidant defense gene expression and suppress cell death in cultured tobacco cells under salt stress. *J. Plant Physiol.* 166: 146-156.

Bai, N. R., Banu, N. R. L. Prakash, J. W. & Goldi, S. J., (2007). Effects of *Asparagopsis taxiformis* extract on the growth and yield of *Phaseolus aureus*. *J. Basic Appl. Biol.* 1: 6-11.

Basak, A. (2008). Effect of preharvest treatment with seaweed products, Kelpak and Goemar BM 86 on fruit quality in apple. *Int. J. Fruit Sci.* 8: 1-14.

Batista-Santos, P. (2010). Molecular responses of *Coffea* spp. Tolerance to Low non-freezing Temperatures. Dissertação de Doutoramento em Biologia. Instituto Superior de Agronomia. Lisboa.

Battacharyya, D., Babgohari, M. Z., Rathor, P. & Prithiviraj, B. (2015). Seaweed extracts as biostimulants in horticulture. *Sci. Hort.* 196: 39-48.

Benincasa, B., Pace, R., Quinet, M. & Lutts, S. (2013). Effect of salinity and priming on seedling growth in rapeseed (*Brassica napus* var. *oleifera* Del.). *Acta Scientiarum. Agronomy* 35: 479-486.

Bimi®: Como se cultiva. (Consultado a 15/01/2018; disponível em: <https://bimi.es/pt-pt/como-se-cultiva-pt/>)

Bray, E. A. (1997). Plant responses to water deficit. Trends. *Plant Sci.* 2: 48-54.

Breuer, G., Lamers, P. P., Martens, D. E., Draaisma, R. B. & Wijffels, R. H. (2012). The impact of nitrogen starvation on the dynamics of triacylglycerol accumulation in nine microalgae strains. *Bioresour. Technol.* 124: 217-226.

Breuer, G., Lamers, P. P., Martens, D. E., Draaisma, R. B. & Wijffels, R. H. (2013). Effect of light intensity, pH, and temperature on triacylglycerol (TAG) accumulation induced by nitrogen starvation in *Scenedesmus obliquus*. *Bioresour. Technol.* 143: 1-9.

Câmara Municipal de Torres Vedras (2015). Plano Municipal de Defesa da Floresta Contra Incêndios-Concelho de Torres Vedras. Comissão Municipal de Defesa da Floresta Contra Incêndios-Gabinete Técnico Florestal. (Consultado a 25/07/18; disponível em: [http://www.biblioteca-tvedras.pt/cmtvedras.pt/gtf/PMDFCI_\(download\)/CadernoiI_InformacaoBase.pdf](http://www.biblioteca-tvedras.pt/cmtvedras.pt/gtf/PMDFCI_(download)/CadernoiI_InformacaoBase.pdf))

Crowe, J. (2007). Trehalose As a “Chemical Chaperone”. *Molecular Aspects of the Stress Response: Chaperones, Membranes and Networks* 594: 143-158.

del Carmen Martinez-Ballesta M., Bastias E. & Carvajal M. (2008). Combined effect of boron and salinity on water transport: the role of aquaporins. *Plant Signaling & Behavior* 3: 844-845.

del Carmen Rodríguez-Hernández M., Moreno D. A., Carvajal M. & del Carmen Martínez Ballesta M. (2013). Interactive effects of boron and NaCl stress on water and nutrient transport in two broccoli cultivars. *Functional Plant Biol.* 40: 739-748.

Chinnusamy, V., Jagendorf, A. & Zhu, J.-K. (2005). Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Sci.* 45: 437-448.

Che, C., Yeh, K., Aisyah, R., Lee, D. & Chang, J. (2011). Cultivation, photobioreactor design and harvesting of microalgae for biodiesel production: a critical review. *Bioresour. Technol.* 102: 71-81.

Chen, T. & Murata, N. (2008). Glycinebetaine: an effective protectant against abiotic stress in plants. *Trends in Plant Sci.* 13: 499-505.

Chunhachart, O., Kotabin, N., Yadee, N., Tahara, Y. & Issakul, K. (2014). Effect of Lead and γ -Polyglutamic Acid Produced from *Bacillus subtilis* on Growth of *Brassica chinensis* L. *Asia-Pacific Chem., Biol. & Environ. Engineering Society Procedia* 10: 269-274.

Craigie, J. S. (2011). Seaweed extract stimuli in plant science and agriculture. *J. Appl. Phycol.* 23: 371–393.

Cramer, G. R., Urano, K., Delrot, S., Pezzotti, M. & Shinozaki, K., (2011). Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC Plant Biol.* 11: 163.

- Davies, W., Kudoyarova, G. & Hartung, W. (2005). Long-distance ABA signaling and its relation to other signaling pathways in the detection of soil drying and the mediation of the plant's response to drought. *J. Plant Growth Regul.* 24: 285-295.
- Dekker, M., Verkerk, R. & Jongen, W. (2000). Predictive modelling of health aspects in the food production chain: a case study on glucosinolates in cabbage. *Trends Food Sci. Technol.* 11: 174-181.
- Di Caprio, F., Altimari, P. & Pagnanelli, F. (2018). Effect of Ca²⁺ concentration on *Scenedesmus* sp. growth in heterotrophic and photoautotrophic cultivation. *New Biotechnol.* 40: 228-235.
- Di Caprio, F., Altimari, P., Toro, L. & Pagnanelli, F. (2015). Effect of lipids and carbohydrates extraction on astaxanthin stability in *Scenedesmus* sp. *Chem. Eng. Trans.* 43: 205-210.
- Diaz-Zarita, M., Fernandez-Canigia, M. V. & Grosso, G. A., (2001). Application of foliar fertilizers containing glycine betaine improves wheat yields. *J. of Agronomy and Crop Sci.* 186: 209-215.
- El-Hendawy, S. E., Hu, Y. & Schmidhalter, U. (2005). Growth, ion content, gas exchange, and water relations of wheat genotypes differing in salt tolerances. *Australian J. of Agric. Res.* 56: 123-134.
- Esquível, M. G. (2015). As algas, um mar de oportunidades a explorar. *Boletim Sociedade Científica da Universidade Católica Portuguesa* 2015: 6-10.
- Fahey, J., Zalcmaan, J. & Talalay, P. (2001). The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochem.* 56: 5-51.
- FAOSTAT (2018). FAO Statistics database-online. (Consultado a 29/09/2018; disponível em: <http://faostat3.fao.org>).
- Filippou, P., Bouchagier, P., Skotti, E., & Fotopoulos, V. (2013). Proline and reactive oxygen/nitrogen species metabolism is involved in the tolerant response of the invasive plant species *Ailanthus altissima* to drought and salinity. *Environ. and Exp. Bot.* 97: 1-10.
- Flores, P., Botella, M. A., Cerdá, A. & Martínez, V. (2004). Influence of nitrate level on nitrate assimilation in tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants under saline stress. *Can. J. Bot.* 82: 207-213.
- Fowke, J., Chung, F., Jin, F., Qi, D., Cai, Q., Conaway, C., Cheng, J., Shu, X., Gao, Y. & Zheng, W. (2003). Urinary isothiocyanate levels, *Brassica*, and human breast. *Cancer Res.* 63: 3980-3986.

Fresh Plaza (2012). UK: Tenderstem® tops sales in 2011. (Publicado a 01.09.12; disponível em: http://www.freshplaza.com/news_detail.asp?id=91398).

Gao, J. & Lan, T. (2016). Functional characterization of the late embryogenesis abundant (LEA) protein gene family from *Pinus tabulaeformis* (Pinaceae) in *Escherichia coli*. *Scientific reports* 6: 19467.

Garcia-Gonzalez, J. (2014). Evaluation of Potential Agricultural Applications of the Microalga *Scenedesmus dimorphus*. A Thesis Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree Master of Science. Arizona State University.

Garcia-Gonzalez, J. & Sommerfeld, M. (2016). Biofertilizer and biostimulant properties of the microalga *Acutodesmus dimorphus*. *J. Appl. Phycol.* 28: 1051-1061.

Ghugre, S., Rai, A., Khandagale, B. & Penna, S. (2011). Salt-induced stress responses of *Brassica* (*Brassica juncea* L.) genotypes. *Archives of Agronomy and Soil Science*. Vol. 57, No. 2: 127-136.

Gill, S. & Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiol. and Biochem.* 48: 909-930.

Gorham, J., Jokinen, K., Malik, M. N. A. & Khan, I. A. (2000). Glycinebetaine treatment improves cotton yields in field trails in Pakistan. Proceedings of World Cotton Res. Conference-II, Athens, Greece: 624-627.

Gouveia, L. & Oliveira, A. C. (2009). Microalgae as a raw material for biofuels production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36: 269-274.

Grzesik, M., Romanowska-Duda, Z. & Kalaji, H. (2017). Effectiveness of cyanobacteria and green algae in enhancing the photosynthetic performance and growth of willow (*Salix viminalis* L.) plants under limited synthetic fertilizers application. *Photosynthetica* 55: 510-521.

Hanf, V. & Gonder, U. (2005). Nutrition and primary prevention of breast cancer: foods, nutrients and breast cancer risk. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* 123: 139-149.

Hall, J., Tisdale, T., Donohue, K., Wheeler, A., Al-Yahya, M. & Kramer, E. (2011). Convergent evolution of a complex fruit structure in the tribe *Brassiceae* (*Brassicaceae*). *American J. of Bot.* 98: 1989-2003.

Hasanuzzaman, M., Alam, M., Rahman, A., Hasanuzzaman, M., Nahar, K. & Fujita, M. (2014). Exogenous proline and glycine betaine-mediated upregulation of antioxidant defense and glyoxalase systems provides better protection against salt-induced oxidative stress in two rice (*Oryza sativa* L.) varieties. *Biomed. Res. International*: 17 pp.

- Hedges, L. & Lister, C. (2006). Nutritional Attributes of *Brassica* vegetables. *Crop & Food Res. Confidential Report* No. 1618: 46 pp.
- Heimler, D., Vignolini, P., Dini, M., Vincieri, F. & Romani, A. (2005). Antiradical activity and polyphenol composition of local *Brassicaceae* edible varieties. *Food Chem.* 99: 464-469.
- Hezayen, F. F., Rehm, B. H., Tindall, B. J. & Steinbuchel, A. (2001). Transfer of *Natrialba asiatica* B1T to *Natrialba taiwanensis* sp. nov. and description of *Natrialba aegyptiaca* sp. nov., a novel extremely halophilic, aerobic, non-pigmented member of the Archaea from Egypt that produces extracellular poly(glutamic acid). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 1133-1142.
- Ho, S., Chen, C., Lee, D. & Chang, J., (2011). Perspectives on microalgal CO₂ emission mitigation systems – a review. *Biotechnol. Advances* 29: 189-198.
- INIAP-Laboratório Químico Agrícola Rebelo da Silva (2006). *Manual de fertilização das culturas*. Laboratório Químico Agrícola Rebelo da Silva, Lisboa: 282 pp.
- Iqbal, N., Ashraf, M. & Ashraf, M. Y. (2008). Glycinebetaine, an osmolyte of interest to improve water stress tolerance in sunflower (*Helianthus annuus* L.): water relations and yield. *South African J. of Bot.* 74: 274-281.
- Jena, J., Pradhan, N., Nayak, R. R., Dash, B. P., Sukla, L. B., Panda, P. K. & Mishra, B. K. (2014). Microalga *Scenedesmus* sp.: A Potential Low-Cost Green Machine for Silver Nanoparticle Synthesis. *J. Microbiol. Biotechnol.* 24: 522-533.
- Kasinathan, V. & Wingler, A. (2004). Effect of reduced arginine decarboxylase activity on salt tolerance and on polyamine formation during salt stress in *Arabidopsis thaliana*. *Physiol. Plantarum*, Copenhagen 121: 101-107.
- Kasukabe, Y., He, L., Nada, K., Misawa, S., Ihara, I. & Tachibana, S. (2004). Overexpression of spermidine synthase enhances tolerance to multiple environmental stresses and up-regulates the expression of various stressregulated genes in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant & Cell Physiol.* 45: 712-722.
- Khan, W., Rayirath, U. P., Subramanian, S., Jithesh, M. N., Rayorath, P., Hodges, D. M., Critchley, A. T., Craigie, J. S., Norrie, J. & Prithviraj, B. (2009). Seaweed extracts as biostimulants of plant growth and development. *J. Plant Growth Regul.* 28: 386-399.
- Kibria, M., Hossain, M., Murata, Y. & Hoque, M. (2017). Antioxidant Defense Mechanisms of Salinity Tolerance in Rice Genotypes. *Rice Sci.* 24: 155-162.

- Kocira, A., Swieca, M., Kocira, S., Złotek, U. & Jakubczyk, A. (2018). Enhancement of yield, nutritional and nutraceutical properties of two common bean cultivars following the application of seaweed extract (*Ecklonia maxima*). *Saudi J. of Biol. Sci.* 25: 563-571.
- Krause, G. H. & Weis, E. (1991). Chlorophyll fluorescence and photosynthesis: the basics. *Annual Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 313-349.
- Kwon, T., Harris, P., Bourne, W. & Lee, W. (2000). Salt-induced reduction of growth in - *Brassica Rapa* L. *Acta Hort.* 511: 157-164.
- Li, X., Liu, Z., Liu, Z., Zheng, Y., Zhang, H., Li, G. & Huang, H. (2015). Preliminary Report on the Breeding of F₁ Hybrid Between Broccolini with High Sulforaphane. *Agric. Sci. & Technol.* 16: 1672-1675.
- Lichtenthaler, H. K. (1996). Vegetation stress: An introduction to the stress concept in plants. *J. Plant Physiol.* Vol. 148: 4-14.
- Lisiecka, J., Knaflewski, M., Spizewski, T., Fraszczak, B., Kaluzewicz, A. & Krzesinski, W. (2011). The effect of animal protein hydrolysate on quantity and quality of strawberry daughter plants cv. 'Elsanta'. *Acta Sci. Pol. Hortorum Cultus* 10: 31-40.
- Liu, J., Yuan, C., Hu, G. & Li, F. (2012). Effects of Light Intensity on the Growth and Lipid Accumulation of Microalga *Scenedesmus* sp. 11-1 Under Nitrogen Limitation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 166: 2127-2137.
- Lu, C., Qiu, N., Wang, B. & Zhang, J. (2003). Salinity treatment shows no effects on photosystem II photochemistry, but increases the resistance of photosystem II to heat stress in halophyte *Suaeda salsa*. *J. of Exp. Bot.*, Vol. 54, No. 383: 851-860.
- Lutts, S. (2000). Exogenous glycine betaine reduces sodium accumulation in salt-stressed rice plants. *Int. Rice Res. Notes* 25: 39-40.
- Lyson, T. A. (2002). Advanced agricultural biotechnologies and sustainable agriculture. *Trends Biotechnol.* 20: 193-196.
- Ma, C., Zhang, Y., Ho, Xing, D., Ren, N. & Liu, B. (2017). Cell growth and lipid accumulation of a microalgal mutant *Scenedesmus* sp. Z-4 by combining light/dark cycle with temperature variation. *Biotechnol. Biofuels* 10: 260.
- Ma, Q. Q., Li, Y. H., Li, D. Q., Wang, W. & Zou, Q. (2006). Alleviation of photoinhibition in drought-stressed wheat (*Triticum aestivum* L.) by foliar applied glycine betaine, *J. of Plant Physiol.* 163: 165-175.

- Maggioni, L. (2015). Domestication of *Brassica oleracea* L. Ph. D. thesis, Swedish University of Agricultural Sciences.
- Makela, P., Jokinen, K., Kontturi, M., Peltonen-Sainio, P., Pheu, E. & Somersalo, S. (1998). Foliar application of glycine betaine a novel product from sugar beet as an approach to increase tomato yield. *Industrial Crop Production* 7: 139-148.
- Mandal, S. & Mallick, N. (2009). Microalga *Scenedesmus obliquus* as a potential source for biodiesel production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 84: 281-291.
- Martínez-Hernández, G. B., Artés-Hernández, F. Gómez, P. & Artés, F. (2013). Induced changes in bioactive compounds of kailan-hybrid broccoli after innovative processing and storage. *J. of Functional Foods* 5: 133-143.
- Martínez-Hernández, G. B., Gómez, P., Pradas, I., Artés, F. & Artés-Hernández, F. (2011). Moderate UV-C pretreatment as a quality enhancement tool in fresh-cut Bimi® broccoli. *Postharvest Biol. and Technol.* 62: 327-337.
- Matysiak, K., Kaczmarek, S. & Krawczyk, R. (2011). Influence of seaweed extracts and mixture of humic and fulvic acids on germination and growth of *Zea mays* L. *Acta Sci. Pol. Agric.* 10: 33-45.
- Mazur, H., Konop, A. & Synak, R. (2001). Indole-3-acetic acid in the culture medium of two axenic green microalgae. *J. Appl. Phycol.* 13: 35-42.
- McLean, R., Beauchemin, D., Clapham, L. & Beveridge, T. (1990). Metal-binding characteristics of the gamma-glutamyl capsular polymer of *Bacillus licheniformis* ATCC 9945. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 3671-3677.
- Mehta, P., Jajoo, A., Mathur, S. & Bharti, S. (2010). Chlorophyll a fluorescence study revealing effects of high salt stress on photosystem II in wheat leaves. *Plant Physiol. Biochem.* 48:16-20.
- Mithen, R., Faulkner, K., Magrath, R., Rose, P., Williamson, G. & Marquez, J. (2003). Development of isothiocyanate-enriched broccoli and its enhanced ability to induce phase 2 detoxification enzymes in mammalian cells. *Theor. Appl. Gen.* 106: 727-734.
- Mittal, S., Kumari, N. & Sharma, V. (2012). Differential response of salt stress on *Brassica juncea*: Photosynthetic performance, pigment, proline, D1 and antioxidant enzymes. *Plant Physiol. and Biochem.* 54: 17-26.
- Munns, R., (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant Cell and Environ.* 25: 239-250.

- Munns, R. (2005). Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytol.* 167: 645-663.
- Munns, R., James, A. & Launchli, A. (2006). Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *J. of Exp. Bot.*, Vol. 57: 1025-1043.
- Munns, R. & Tester, M. (2008). Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 651-681.
- Nabati, D. A., Schmidt, R. E. & Parrish, D. J. (1994). Alleviation of salinity stress in Kentucky bluegrass by plant growth regulators and iron. *Crop Sci* 43: 198-202.
- Nawaz, K., Hussain, K., Majeed, A., Khan, F., Afghan, S. & Ali, K. (2010). Fatality of salt stress to plants: Morphological, physiological and biochemical aspects. *African J. of Biotechnol.*, Vol. 9: 5475-5480.
- OECD (2012). Consensus document on the biology of the *Brassica* crops (*Brassica* sp.). OECD Environment, Health and Safety Publications Series on Harmonisation of Regulatory Oversight in Biotechnology, N° 54. Paris: Environment Directorate, Organisation for Economic Co-operation and Development.
- Ogunleye, A., Bhat, A., Irorere, V., Hill, D., Williams, C. & Radecka, I. (2015). Poly-glutamic acid: production, properties and applications. *Microbiol.* 161: 1-17.
- Oh, E., Kim, Y., Kwon, R. & Lee, H. (2011). Enhanced level of anthocyanin leads to increased salt tolerance in *Arabidopsis* PAP1-D plants upon sucrose treatment. *J. of the Korean Society for Appl. Biol. Chem.* 54: 79-88.
- Ohnishi, N. & Murata, N. (2006). Glycine betaine counteracts the inhibitory effects of salt stress on the degradation and synthesis of D1 protein during photoinhibition in *Synechococcus* sp. PCC 7942. *Plant Physiol.* 141: 758-765.
- Ortuño, T. (2014). Respuesta de las Plantas de Tomate a la Combinación de Salinidad y Altas Temperaturas. Dissertação de Doutorado em Biologia. Faculdade de Biologia, Universidade de Murcia.
- Parida, A. & Das, A. (2005). Salt tolerance and salinity effects on plants: a review. *Ecotoxicol. and Environ. Safety* 60: 324-349.
- Park, B., Liu, Z., Kanno, A. & Kameya, T. (2005). Genetic improvement of Chinese cabbage for salt and drought tolerance by constitutive expression of a *B. napus* LEA gene. *Plant. Sci.* 169: 553-558.

Park, E. J., Jeknic, Z. & Chen, T. H. H. (2006). Exogenous application of glycinebetaine increases chilling tolerance in tomato plants. *Plant Cell Physiol.* 47: 706-714.

Paško, P., Tyszka-Czochara, M., Galanty, A., Gdula-Argasińska, J., Żmudzki, P., Bartoń, H., Zagrodzki, P. & Gorinstein, S. (2018). Comparative Study of Predominant Phytochemical Compounds and Proapoptotic Potential of Broccoli Sprouts and Florets. *Plant Foods for Human Nutrition* 73: 95-100.

Pedroche, J., Yust, M., Lqari, H., Giron-Calle, J., Alaiz, M., Vioque, J. & Millan, F. (2004). *Brassica carinata* protein isolates: chemical composition, protein characterization and improvement of functional properties by protein hydrolysis. *Food Chem.* 88: 337-346.

Pereira, L. (1998). Algas Marinhas - Um Recurso Para o Próximo Milénio. Prémio Francisco de Holanda – Projecto na Área das Ciências Naturais - Expo 98.

Pirastu, L., Perreault, F., Chu, F. L., Oukarroum, A., Sleno, L., Popovic, R. & Dewez, D. (2012). Long-term stress induced by nitrate deficiency, sodium chloride, and high light on photosystem II activity and carotenogenesis of green alga *Scenedesmus* sp. *Botany* 90: 1007-1014.

Povero, G., Mejia, J. F., Di Tommaso, D., Piaggese, A. & Warrior, P. (2016). A Systematic Approach to Discover and Characterize Natural Plant Bioestimulants. *Frontiers in Plant Sci.* 7: 1-9.

Prasch, C. & Sonnewald, U. (2013). Simultaneous application of heat, drought, and virus to *Arabidopsis* plants reveals significant shifts in signaling networks. *Plant Physiol.* 162: 1849-1866.

Rasheed, R., Ashraf, M., Parveen, S., Iqbal, M. & Hussain, I. (2012). Effect of Salt Stress on Different Growth and Biochemical Attributes in Two Canola (*Brassica napus* L.) Cultivars. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 45: 669-679.

Rasmussen, S., Barah, P., Suarez-Rodriguez, M. C., Bressendorff, S., Friis, P., Costantino, P., Bones, A. M., Nielsen, H. B. & Mundy, J. (2013). Transcriptome responses to combinations of stresses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 161: 1783-1794.

Rhodes, D. & Hanson, A. D. (1993). Quaternary ammonium and tertiary sulfonium compounds in higher plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 44: 357-384.

Rivero, R. M., Mestre, T. C., Mittler R., Rubio, F., Garcia-Sanchez, F. & Martinez V. (2014). The combined effect of salinity and heat reveals a specific physiological, biochemical and molecular response in tomato plants. *Plant, Cell & Environ.* 37: 1059-1073.

Rizhsky, L., Liang, H., Shuman, J., Shulaev, V., Davletova, S. & Mittler, R. (2004). When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiol.* 134: 1683-1696.

Rodrigues, A. (2005). Adaptação do *Lupinus albus* L. ao déficit hídrico Caracterização Fisiológica e Bioquímica. Dissertação do Curso de Mestrado em Produção Vegetal. Instituto Superior de Agronomia, Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.

Rosescu, M. & Chitu, E. (2009). Influence of anthropic conditions on Pitesti, Mioveni and Maracineni dominant weeds photosystem II efficiency using Chlorophyll fluorescence. *Scientific Papers of the R.I.F.G. Pitesti.* XXV: 151-157.

Rouphael, Y., De Micco, V., Arena, C., Raimondi, G., Colla, G. & De Pascale, S. (2017). Effect of *Ecklonia maxima* seaweed extract on yield, mineral composition, gas exchange, and leaf anatomy of zucchini squash grown under saline conditions. *J. of Appl. Phycol.* 29: 459-470.

Saadaoui, I., Sedky, R., Rasheed, R., Bounnit, T., Almahmoud, A., Elshekh, A., Dalgamouni, T., Al Jmal, K., Das, P. & Al Jabri, H. (2018). Assessment of the algae-based biofertilizer influence on date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivation. *J. of Appl. Phycol.*: 1-7.

Sakamoto, A. & Murata, N., (2002). The role of glycine betaine in protection of plants from stress clues from transgenic plants. *Plant, Cell & Environ.* 25: 163-171.

Sander mann, H. (2004). Molecular ecotoxicology: from man-made pollutants to multiple environmental stresses. In: Sander mann H, ed. Molecular ecotoxicology of plants. Berlin, Heidelberg, Germany: Springer: 1–16.

Schreiber, C., Schiedung, H., Harrison, L., Briese, C., Ackermann, B., Kant, J., Schrey, S., Hofmann, D., Singh, D., Ebenhöf, O., Amelung, W., Schurr, U., Mettler-Altmann, T., Huber, G., Jablonowski, N. & Nedbal, L. (2018). Evaluating potential of green alga *Chlorella vulgaris* to accumulate phosphorus and to fertilize nutrient-poor soil substrates for crop plants. *J. of Appl. Phycol.* 18: 1390-1399.

Sharma, H., Fleming, C., Selby, C., Rao, J. & Martin, T. (2014). Plant biostimulants: a review on the processing of macroalgae and use of extracts for crop management to reduce abiotic and biotic stresses. *J. Appl. Phycol.* 26: 465-490.

Shih, I. L. & Van, Y. T. (2001). The production of poly (c-glutamic acid) from microorganisms and its various applications. *Bioresour. Technol.* 79: 207-225.

Shrivastava, P. & Kumar, R. (2015). Soil salinity: a serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. *Saudi J. Biol. Sci.* 22: 123-131.

- Siddiqui, M., Mohammad, F. & Khan, M. (2009). Morphological and physio-biochemical characterization of *Brassica juncea* L. Czern. & Coss. genotypes under salt stress. *J. of Plant Interactions* Vol. 4: 67-80.
- Silvestre, S., Araújo, S., Vaz Patto, M. & Marques da Silva J. (2014). Performance index: An expeditious tool to screen for improved drought resistance in the *Lathyrus* genus. *J. Integr. Plant Biol.* 56: 610-21.
- Skirycz, A. & Inze, D. (2010). More from less: plant growth under limited water. *Curr. Opinion in Biotechnol.* 21: 197-203.
- Skulberg, O. (2004). Bioactive chemicals in microalgae. Handbook of microalgal culture. *Biotechnol. and Appl. Phycol. Blackwell*, Oxford, UK: 485–512.
- Storey, R. & Wyn, J. (1975). Betaine and choline levels in plants and their relationship to NaCl stress. *Plant Sci. Letter* 4: 161-168.
- Strasser, R., Tsimilli-Michael, M. & Srivastava, A. (2004). Analysis of the Chlorophyll a Fluorescence Transient. Chlorophyll A Fluorescence: A Signature of Photosynthesis. *Springer, Dordrecht*: 321–362.
- Suganya, T., Varman, M., Masjuki, H. & Renganathan, S. (2016). Macroalgae and microalgae as a potential source for commercial applications along with biofuels production: A biorefinery approach. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 55: 909-941.
- Sulpice, R., Tsukaya, H., Nonaka, H., Mustardy, L., Chen, T. & Murata, N. (2003). Enhanced formation of flowers in salt-stressed *Arabidopsis* after genetic engineering of the synthesis of glycinebetaine. *The Plant J.* 36: 165-176.
- Sultana, V., Ehteshamul-Haque, S., Ara, J. & Athar, M. (2005). Comparative efficacy of brown, green and red seaweeds in the control of root infecting fungi and okra. *Int. J. Environ. Sci. Tech.* 2: 129-132.
- Suzuki, N., Rivero, R. M., Shulaev, V., Blumwald, E. & Mittler, R. (2014). Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytol.* 203: 32-43.
- Szabados, L. & Saviouré, A. (2010). Proline: a multifunctional amino acid. *Trends in Plant Sci.* 15: 89-97.
- Tadeo, F. (2000). Fisiología de las plantas y el estrés. Em Fundamentos de Fisiología Vegetal. Edicions Universitat de Barcelona, Barcelona: 481-498.
- Taiz, L. & Zeiger, E. (2010) Plant Physiology, Third Edition. Sinauer. Sunderland.

- Thirupal, D., Madhumathi, C., Syam, P. & Reddy, D. (2014). Effect of planting density and transplanting time on growth and curd yield of broccoli. *International J. of Hortic. and Floric.* Vol. 5. pp: 301-303.
- Tian, F., Wang, W., Lianga, C., Wang, X., Wanga, G. & Wang, W. (2016). Overaccumulation of glycinebetaine makes the function of the thylakoid membrane better in wheat under salt stress. *The Crop J.* 5: 73-82.
- Tilman, D., Cassman, K., Matson, P., Naylor, R. & Polasky, S. (2002). Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 418: 671-677.
- Verslues, P., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J. & Zhu, J., (2006). Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant J.* 45: 523-539.
- Verslues, P. & Zhu, J., (2005). Before and beyond ABA: upstream sensing and internal signals that determine ABA accumulation and response under abiotic stress. *Biochem. Soc. Transactions* Vol. 33: 375-379.
- Vieira, V. & Santos, M. (1995). Directório de Aqualcultura e Biotecnologia Marinha. Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa: 188 pp.
- Viegas, R., Silveira, A., Junior, J., Queiroz, M. & Fausto, M. (2001). Effect of NaCl salinity on growth and inorganic solute accumulation in young cashew plants. *Braz. J. Agric. Eng.* 5: 216-222.
- Wang, B. & Zhang, X. (2012). Inhibitory Effects of Broccolini Leaf Flavonoids on Human Cancer Cells. *Scanning* 343: 1-5.
- Wang, L., Giovannucci, E., Hunter, D., Neuberg, D., Su, L. & Christiani, D. (2004a). Dietary intake of cruciferous vegetables, glutathione S-transferase (GST) polymorphisms and lung cancer risk in a Caucasian population. *Cancer Cause Control* 15: 977-985.
- Wang, Q., Chen, S., Zhang, J., Sun, M., Liu, Z. & Yu, Z. (2008). Coproducing lipopeptides and poly-c-glutamic acid by solid-state fermentation of *Bacillus subtilis* using soybean and sweet potato residues and its biocontrol and fertilizer synergistic effects. *Bioresour. Technol.* 99: 3318-3323.
- Wang, W., Vinocur, B., Shoseyov, O. & Altman, A. (2004b). Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends in Plant Sci.* Vol. 9: 244-252.
- Washington State University (s.d.). Vegetable Research and Extension: Broccolini® (Consultado em 15/01/18; disponível em: <http://agsyst.wsu.edu/Broccolini.html>)

- WeiBing, X. & Rajashekar, C. (2001). Glycine betaine involvement in freezing tolerance and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Environ. Exp. Bot.* 46: 21-28.
- Xu, P., Zhang, T., Guo, X., Ma, C. & Zhang, X. (2015). Purification, Characterization, and Biological Activities of Broccolini Lectin. *Biotechnol. Progress* 31: 736-743.
- Yancey, P. (2005). Organic osmolytes as compatible, metabolic and counteracting cytoprotectants in high osmolarity and other stresses. *The J. of Exp. Biol.* 208: 2819-2830.
- Yang, Y., Yan, H., Li, Y., Yang, S. & Zhang, X. (2011). Isothiocyanates from Broccolini seeds induce apoptosis in human colon cancer cells: proteomic and bioinformatic analyses. *Pharmazie* 66: 382-390.
- Yu, B. & Benning, C. (2003). Anionic lipids are required for chloroplast structure and function in *Arabidopsis*. *Plant J.* 36: 762-770.
- Zhang, L., Yang, X., Gao, D., Wang, L., Li, J., Wei, Z. & Shi, Y. (2017). Effects of poly- γ glutamic acid (γ -PGA) on plant growth and its distribution in a controlled plantsoil system. *Scientific Reports* 7: 6090.
- Zhang, X. & Schmidt, R. (2000). Hormone-containing products' impact on antioxidant status of tall fescue and creeping bentgrass subjected to drought. *Crop Sci.* 40: 1344-1349.
- Zhao, G., Ma, B. & Ren, C., (2007). Growth, gas exchange, chlorophyll fluorescence, and ion content of naked oat in response to salinity. *Crop Sci.* 47: 123-131.
- Zhu, Y., Qian, W. & Hua, J. (2010). Temperature modulates plant defense responses through NB-LRR proteins. *PLoS Pathogens. J. of Appl. Phycol.* 6: 1-12.
- Zodape, S., Gupta, A., Bhandari, S., Rawat, U., Chaudhary, D., Eswaran, K. & Chikara, J. (2011). Foliar application of seaweed sap as bioestimulant for enhancement of yield and quality of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *J. of Scientific & Industrial Res.* 70: 215-219.

Anexos

Anexo I - Ficha técnica do bioestimulante Vegetal B45 (Glicina betaína)

Ficha Técnica de Produto: VEGETAL B45

Referência: FT-00207

COMPOSIÇÃO GARANTIDA

Azoto (N) total	5,4% p/v	4,5% p/p
Azoto (N) orgânico	5,4% p/v	4,5% p/p
Óxido de potássio (K ₂ O) solúvel em água	6,0% p/v	5,0% p/p
Glicina betaína	30,0% p/v	25,0% p/p
Matéria orgânica	28,8% p/v	24,0% p/p

Aminograma:

ÁCIDO ASPARTICO	0,12%
ÁCIDO GLUTAMICO	0,07%
ALANINA	0,06%
ASPARAGINA	0,19%
BETAÍNA	24,9%
FENILALANINA	0,11%
GLICINA	0,17%
ISOLEUCINA	0,60%
ISTIDINA	0,04%
LEUCINA	0,50%
METIONINA	0,03%
ORNITINA	0,01%
SERINA	0,52%
TIROSINA	0,32%
TREONINA	0,48%
VALINA	0,78%

CLASSIFICAÇÃO

Adubo organomineral NK fluido 4,5-0-5

Registo n.º 73/2016.

PROPRIEDADES FÍSICAS E QUÍMICAS

Estado físico	Líquido
Densidade (kg/l)	1,20
CE (mS/cm)	—
pH	11,5
Matérias primas	Melaço de beterraba desaçucarado (83%) Carbonato de potássio (17%)

PROPRIEDADES

O Vegetal B45 é um fertilizante líquido de origem 100% vegetal. A solução rica em substâncias naturais fornece grandes quantidades de glicina betaina, uma molécula com acção osmo-protectora que a planta acumula naturalmente em resposta a situações de *stress* ambiental como altas ou baixas temperaturas (*stress* térmico), seca (*stress* hídrico) e salinidade elevada (*stress* salino). A glicina betaina mantém as funções metabólicas celulares através da ligação a membranas celulares e enzimas. A turgescência da célula é também mantida e assim, evita-se a perda excessiva de água e o colapso celular.

Por conseguinte, o Vegetal B45 provoca o aumento da actividade fotossintética e de fixação de azoto, o que favorece o tamanho, a consistência e a cor dos frutos, logo, contribui para o aumento do prazo de conservação das produções hortícolas pós-colheita.

MODO DE UTILIZAÇÃO E DOSAGEM

O Vegetal B45 foi formulado para aplicação quer por via foliar quer em fertirrega para todas as culturas.

Cultura	Dose	Aplicação
Foliar, com 700 - 1000 l de água/ha		
Hortícolas	5 - 6 kg/ha	Cada 7 – 10 dias durante desenvolvimento vegetativo
Fruteiras, vinha, olival	5 - 6 kg/ha	3 - 5 vezes, do abrolhamento até ao pintor
Cereais	5 - 6 kg/ha	Desde o afilhamento até à bandeira
Fertirrega		
Todas as culturas	15 - 25 kg/ha	A cada 10 - 15 dias

Anexo II - Ficha técnica do bioestimulante Gamma PGA (ácido poliglutâmico)

Ficha Técnica de Produto: GAMMA PGA

Referência: FT-00205

COMPOSIÇÃO GARANTIDA

Azoto (N) total	7,2% p/v	6,0% p/p
Azoto (N) orgânico	7,2% p/v	6,0% p/p
Zinco (Zn) solúvel em água	2,4% p/v	2,0% p/p
Zinco (Zn) quelatado por EDTA	2,4% p/v	2,0% p/p
γ – Ácido poliglutâmico (γ PGA)	3,6% p/v	3,0% p/p
Proteínas	7,2% p/v	6,0% p/p
Açúcares	4,2% p/v	3,5% p/p

Outros componentes de alto valor biológico

Vitamina B1	0,17 mg/100 g
Vitamina B2	0,17 mg/100 g
Vitamina B3	0,47 mg/100 g
Vitamina B5	0,04 mg/100 g
Vitamina B6	2,41 mg/100 g
Vitamina B9	3,13 μ g/100 g
Vitamina H	2,07 μ g/100 g

CLASSIFICAÇÃO

ADUBO CE

E.1.7 (e). Solução de adubo à base de zinco (Zn) quelatado por EDTA.

PROPRIEDADES FÍSICAS E QUÍMICAS

Estado físico	Líquido
Densidade (kg/l)	1,20
CE (mS/cm)	—
pH	5,5

PROPRIEDADES

O Algaman B é um bioestimulante formulado à base de zinco quelatado que inclui uma série de componentes de elevado valor biológico como proteínas, açúcares, vitaminas e, mais notavelmente, o γ -ácido poliglutâmico (γ PGA). As características únicas do Gamma PGA, além de permitirem um incremento da produção das culturas, melhoram as características do solo, com várias vantagens:

- Aumenta a disponibilidade hídrica e de nutrientes à planta;
- Confere maior resistência à salinidade;
- A acção do zinco promove o desenvolvimento radicular.
- Elevada capacidade humectante, uma vez que o γ PGA é um composto muito hidrofílico, capaz de absorver quantidades significativas de água e de as libertar gradualmente;
- Boa capacidade tampão da solução entre valores de pH entre 4 e 9 e tem uma forte eficácia quelatante também para metais;
- Permite uma menor lixiviação de N, P e Ca e promove a solubilização de fosfatos de Ca, Mg e K por meio de uma "quelatação" natural;
- Produto natural, sem resíduos, que reduz a poluição das águas subterrâneas por nitratos e reduz as emissões de CO₂ pela economia de combustível para a rega e processamento.

MODO DE UTILIZAÇÃO E DOSAGEM

O Gamma PGA foi formulado tanto para aplicação foliar como em fertirrega em todas as culturas.

- Foliar: 3 - 5 kg/ha (concentração máxima de 1%); 2 aplicações por mês;
- Fertirrega: 10 - 15 kg/ha (dose mínima de aplicação de 5 kg/ha) por mês.

Manter um intervalo mínimo de 10-12 dias entre aplicações

COMENTÁRIOS

Produto não sujeito a qualquer consideração toxicológica, tanto de transporte como de armazenamento.

Produto para uso agrícola. É aconselhada a aplicação sob assessoramento agronómico.

Temperatura de armazenamento: entre 4 e 25°C.

Agitar bem antes de usar.

P102 Manter fora do alcance das crianças.

P270 Não comer, beber ou fumar durante a utilização deste produto.

P309+P311 EM CASO DE exposição ou de indisposição: Contactar o CENTRO DE INFORMAÇÃO

Anexo III - Ficha técnica do bioestimulante Algaman B (Macroalga *Ecklonia maxima*)

Ficha Técnica de Produto: ALGAMAN B

Referência: FT-00204

COMPOSIÇÃO GARANTIDA

Boro (B) solúvel em água	2,4% p/v	2,0% p/p
Auxinas	11 mg/l	
Citocininas	0,031 mg/l	

*Provenientes da alga *Ecklonia maxima*

CLASSIFICAÇÃO

Extracto de algas. Boro-etanolamina.

PROPRIEDADES FÍSICAS E QUÍMICAS

Estado físico	Líquido
CE (1%) (mS/cm)	—
Densidade (kg/l)	1,20
pH	—

PROPRIEDADES

O Algaman B é um bioestimulante formulado à base de boro que inclui um leque de substâncias naturais semelhantes a hormonas. O boro favorece a assimilação e translocação de cálcio e é essencial para a síntese de hidratos de carbono e translocação de micronutrientes, divisão celular, formação de paredes celulares e síntese de lípidos e proteínas. Desta forma, estimula o crescimento dos novos tecidos da planta, tanto do sistema radicular (que aumenta a capacidade de absorção e nutrientes) como reprodutor (potencia a fertilidade floral). O extracto da alga marinha *Ecklonia maxima* contém substâncias naturais semelhantes a hormonas cuja acção fitoestimulante única se faz sentir mesmo em doses muito reduzidas. Além da função nutricional, o Algaman B também tem acção repelente, protegendo as plantas dos insectos e doenças criptogâmicas, e melhora a resistência da cultura a baixas temperaturas e outros factores de stress.

MODO DE UTILIZAÇÃO E DOSAGEM

O Algaman B foi formulado tanto para aplicação foliar como em fertirrega:

Cultura	Fertirrega	Foliar	Aplicação
Hortícolas de folha	1 - 1,5 kg/ha	200 - 250 g/100 l	Desde as primeiras folhas verdadeiras até à colheita, 3 - 4 aplicações a cada 12 - 15 dias
Hortícolas de fruto	2 - 3 kg/ha	200 - 300 g/100 l	Do pré-transplante até à floração e após o pintor a cada 15 dias
Fruteiras, vinha, olival	Molhar as raízes no pré-transplante, preparar uma solução com 4 kg/100 l de água e submergir as plantas antes do transplante (enxertos-prontos ou bacelos embebidos nesta solução durante 24 horas)		
	2 - 3 kg/ha	200 - 300 g/100 l	Após o abrolhamento, cada 10 - 15 dias
Culturas industriais	1 - 3 kg/ha		Após as primeiras folhas verdadeiras, 2 - 3 tratamentos a cada 15 dias

COMENTÁRIOS

Produto não sujeito a qualquer consideração toxicológica, tanto de transporte e armazenagem.

Produto para uso agrícola. É aconselhada a aplicação sob assessoramento agronómico.

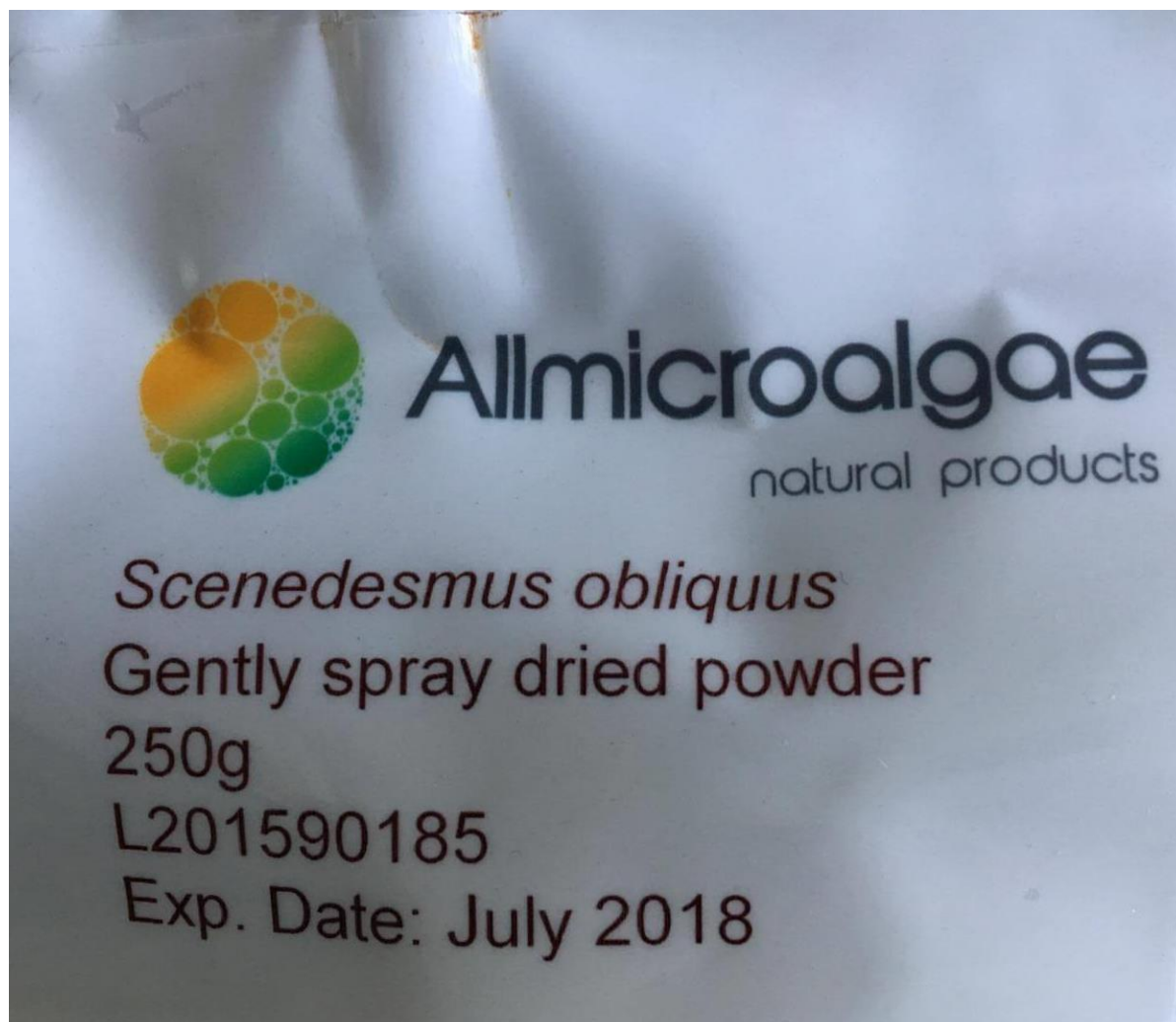
Agitar bem antes de usar.

P102 Manter fora do alcance das crianças.

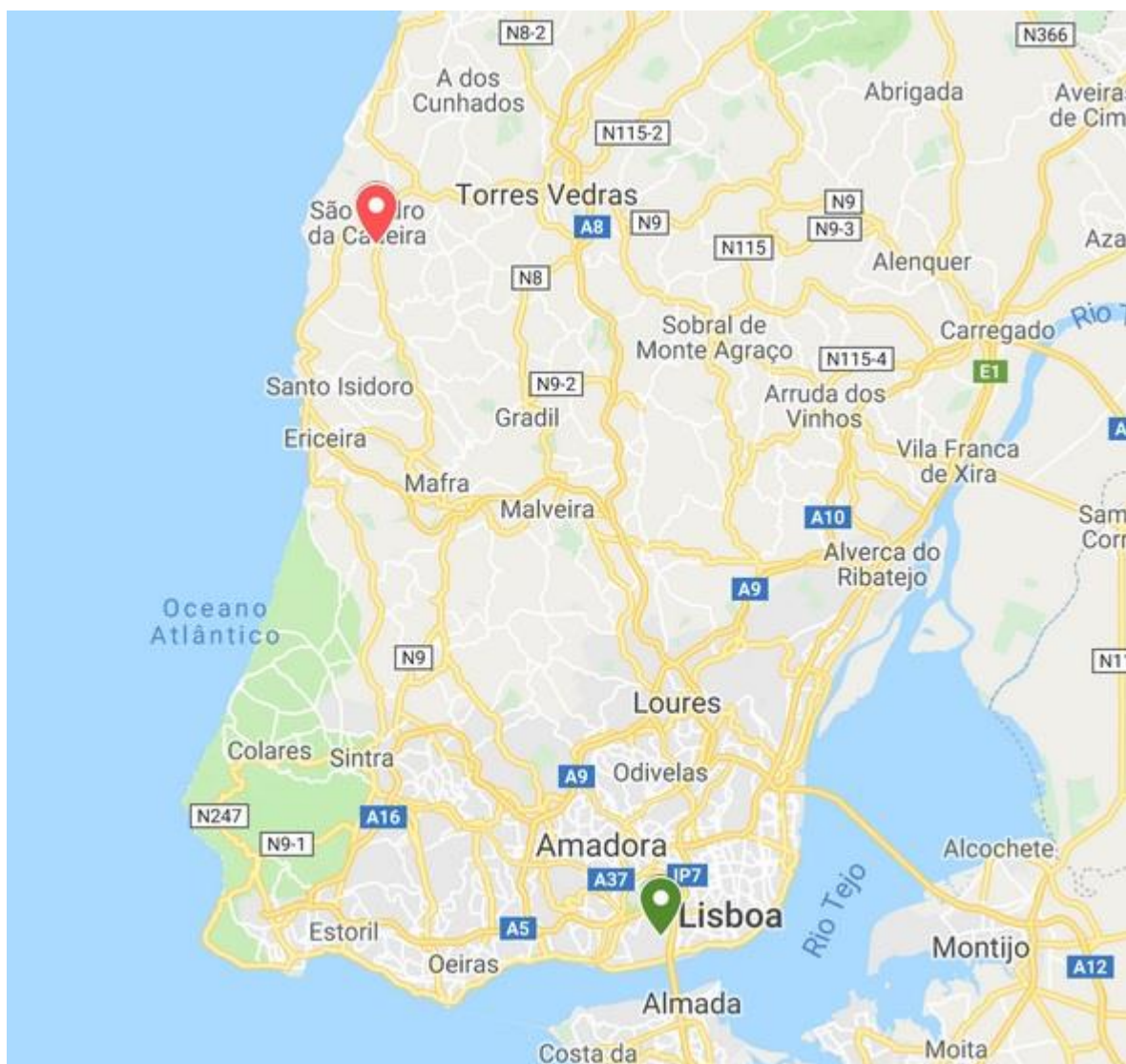
P270 Não comer, beber ou fumar durante a utilização deste produto.

P309+P311 EM CASO DE exposição ou de indisposição: Contactar o CENTRO DE INFORMAÇÃO ANTI- VENENOS ou um médico.

Anexo IV – Rótulo da microalga *Scenedesmus obliquus*.



Anexo V – Localização dos ensaios [A vermelho: localização do ensaio em campo comercial; A verde: localização do ensaio em vasos (ISA)].



Anexo VI – Boletim de análise ao solo do ensaio em campo comercial.



Boletim nº 0119 / 2018

Departamento Ciências e Engenharia de Biosistemas

- Química e Ambiente -

Cliente:	ISA	Data de entrada:	27/02/2018
Código do cliente:	GG - Setor 5	Data de saída:	22/03/2018
Tipo de amostra:	Solo	Cultura:	Não especificada

Parâmetro	Resultado	Observações
Textura de campo	Arenosa Grosseira	
pH (H ₂ O) (1:2,5)	5,3	Ácida
Fósforo extraível (P ₂ O ₅) (mg/kg)	131	Alto (Índice de fertilidade 5)
Potássio extraível (K ₂ O) (mg/kg)	147	Alto (Índice de fertilidade 5)
Cálcio extraível (Ca) (mg/kg)	211	Muito baixo
Magnésio extraível (Mg) (mg/kg)	27	Muito baixo (Índice de fertilidade 1)
Matéria orgânica (%)	0,72	Muito baixo
Condutividade elétrica (1:2) (mS/cm)	0,09	Não salino
Calcário total (CaCO ₃) (%)	<0,5	Não calcário
Acidez de troca (cmol(+)/kg)	0,23	
Sódio (bases de troca) (Na) (cmol(+)/kg)	0,08	Muito baixo
Potássio (bases de troca) (K) (cmol(+)/kg)	0,27	Médio
Cálcio (bases de troca) (Ca) (cmol(+)/kg)	1,05	Muito baixo
Magnésio (bases de troca) (Mg) (cmol(+)/kg)	0,22	Muito baixo
Soma das bases de troca (cmol(+)/kg)	1,62	
CTC efetiva (cmol(+)/kg)	1,85	Muito baixa
Grau de saturação em bases (%)	87,6	Muito alta
Grau de saturação em Ca ²⁺ (%)	56,8	Baixo
Grau de saturação em K ⁺ (%)	14,6	Alto
Grau de saturação em Mg ²⁺ (%)	11,9	Alto
Grau de saturação em Na ⁺ (ESP) (%)	4,3	Baixo, não limitante
Relação Ca troca / Mg troca	4,8	Desfavorável, predomínio do Ca sobre o Mg
Relação K troca / Mg troca	1,2	Alto, predomínio do K sobre o Mg
Ferro extraível (Fe) (mg/kg)	27,7	Médio
Cobre extraível (Cu) (mg/kg)	3,5	Médio
Zinco extraível (Zn) (mg/kg)	1,5	Médio
Manganês extraível (Mn) (mg/kg)	5,2	Muito baixo
Boro extraível (B) (mg/kg)	0,27	Baixo
Necessidade em cal (ton CaCO ₃ /ha)	2	Para elevar o pH (H ₂ O) até 6,5. Ajustar em função da cultura.

Instituto Superior de Agronomia
Departamento de Ciências e Engenharia de Biosistemas
Tapada da Ajuda, 1349-017 Lisboa - PORTUGAL
Tel: + 351 21 365 32 16 email: henriquenibe@isa.utl.pt

O responsável,
Henrique Ribeiro



Métodos

pH (H ₂ O) (1:2,5)	Potenciometria
Fósforo extraível (P ₂ O ₅)	Extração Égner-Rhiem, EAM VIS/UV
Potássio extraível (K ₂ O)	Extração Égner-Rhiem, fotometria de chama
Cálcio extraível (Ca)	Extração com acetato de amónio, ICP
Magnésio extraível (Mg)	Extração com acetato de amónio, ICP
Matéria orgânica	Combustão, deteção de CO ₂ por IV
Condutividade elétrica (1:2)	Conduvimetria
Calcário total (CaCO ₃)	Digestão ácida, deteção de CO ₂ por IV
Acidez de troca	Titulometria
Sódio (bases de troca) (Na)	Extração com acetato de amónio (1:15), ICP
Potássio (bases de troca) (K)	Extração com acetato de amónio (1:15), ICP
Cálcio (bases de troca) (Ca)	Extração com acetato de amónio (1:15), ICP
Magnésio (bases de troca) (Mg)	Extração com acetato de amónio (1:15), ICP
Soma das bases de troca	Cálculo
CTC efetiva	Cálculo
Grau de saturação em bases	Cálculo
Grau de saturação em Ca ²⁺	Cálculo
Grau de saturação em K ⁺	Cálculo
Grau de saturação em Mg ²⁺	Cálculo
Grau de saturação em Na ⁺ (ESP)	Cálculo
Relação Ca troca / Mg troca	Cálculo
Relação K troca / Mg troca	Cálculo
Ferro extraível (Fe)	Extração Lakanen-Ervio, ICP
Cobre extraível (Cu)	Extração Lakanen-Ervio, ICP
Zinco extraível (Zn)	Extração Lakanen-Ervio, ICP
Manganês extraível (Mn)	Extração Lakanen-Ervio, ICP
Boro extraível (B)	Extração com água fervente, ICP
Necessidade em cal	Cálculo

Anexo VII - Boletim de análise ao solo do ensaio em vasos.



Boletim nº 0458 / 2017

Departamento Ciências e Engenharia de Biosistemas - Química e Ambiente -

Cliente:	ISA	Data de entrada:	05/12/2017
Código do cliente:	Ensaio Bróculo	Data de saída:	29/12/2017
Tipo de amostra:	Solo	Cultura:	Não especificada

Parâmetro	Resultado	Observações
Textura de campo	Arenosa	Grosseira
pH (H ₂ O) (1:2,5)	6,6	Neutra
Fósforo extraível (P ₂ O ₅) (mg/kg)	>200	Muito alto (Índice de fertilidade 7)
Potássio extraível (K ₂ O) (mg/kg)	108	Alto (Índice de fertilidade 4)
Cálcio extraível (Ca) (mg/kg)	1 280	Médio
Magnésio extraível (Mg) (mg/kg)	99	Alto (Índice de fertilidade 4)
Azoto nítrico (N-NO ₃ ⁻) (mg/kg)	24,41	
Azoto amoniacal (N-NH ₄ ⁺) (mg/kg)	7,23	
Azoto (N) (g/kg)	0,480	
Matéria orgânica (%)	1,02	Baixo
Razão C\N	1,23	Baixo
Condutividade elétrica (1:2) (mS/cm)	0,21	Não salino
Calcário total (CaCO ₃) (%)	<0,5	Não calcário
Acidez de troca (cmol(+)/kg)	0,07	
Sódio (bases de troca) (Na) (cmol(+)/kg)	0,07	Muito baixo
Potássio (bases de troca) (K) (cmol(+)/kg)	0,16	Baixo
Cálcio (bases de troca) (Ca) (cmol(+)/kg)	6,39	Médio
Magnésio (bases de troca) (Mg) (cmol(+)/kg)	0,81	Baixo
Soma das bases de troca (cmol(+)/kg)	7,43	
CTC efetiva (cmol(+)/kg)	7,5	Baixa
Grau de saturação em bases (%)	99,1	Muito alta
Grau de saturação em Ca ²⁺ (%)	85,2	Alto
Grau de saturação em K ⁺ (%)	2,1	Médio
Grau de saturação em Mg ²⁺ (%)	10,8	Alto
Grau de saturação em Na ⁺ (ESP) (%)	0,9	Baixo, não limitante
Relação Ca troca / Mg troca	7,9	Desfavorável, predomínio do Ca sobre o Mg
Relação K troca / Mg troca	0,2	Adequado
Necessidade em cal (ton CaCO ₃ /ha)	0	Não necessita de calagem



Métodos

pH (H ₂ O) (1:2,5)	Potenciometria
Fósforo extraível (P ₂ O ₅)	Extração Égner-Rhiem, EAM VIS/UV
Potássio extraível (K ₂ O)	Extração Égner-Rhiem, fotometria de chama
Cálcio extraível (Ca)	Extração com acetato de amónio, ICP
Magnésio extraível (Mg)	Extração com acetato de amónio, ICP
Azoto nítrico (N-NO ₃ ⁻)	Espectrofotometria de absorção molecular
Azoto amoniacal (N-NH ₄ ⁺)	Espectrofotometria de absorção molecular
Azoto (N)	Kjeldhal
Matéria orgânica	Combustão, deteção de CO ₂ por IV
Razão C\N	Cálculo
Condutividade elétrica (1:2)	Condutivimetria
Calcário total (CaCO ₃)	Digestão ácida, deteção de CO ₂ por IV
Acidez de troca	Titulometria
Sódio (bases de troca) (Na)	Extração com acetato de amónio (1:15), ICP
Potássio (bases de troca) (K)	Extração com acetato de amónio (1:15), ICP
Cálcio (bases de troca) (Ca)	Extração com acetato de amónio (1:15), ICP
Magnésio (bases de troca) (Mg)	Extração com acetato de amónio (1:15), ICP
Soma das bases de troca	Cálculo
CTC efetiva	Cálculo
Grau de saturação em bases	Cálculo
Grau de saturação em Ca ²⁺	Cálculo
Grau de saturação em K ⁺	Cálculo
Grau de saturação em Mg ²⁺	Cálculo
Grau de saturação em Na ⁺ (ESP)	Cálculo
Relação Ca troca / Mg troca	Cálculo
Relação K troca / Mg troca	Cálculo
Necessidade em cal	Cálculo

Anexo VIII – Esquematização da disposição das modalidades no ensaio em campo comercial.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38

Testemunha

Algaman B (*Ecklonia maxima*)

Gamma PGA (Ácido Poliglutâmico)

Vegetal B 45 (Glicina Betaína)

Anexo IX – Outputs estatísticos da análise de variância (ANOVA) efetuada no programa *Statistix* 9.

Analysis of Variance Table for Índice Colheita

Source	DF	SS	MS	F	P
Bioestimú	4	0.00566	0.00142	1.02	0.4116
Salinidade	1	0.00000	0.00000	0.00	1.0000
Bioestimú*Salinidade	4	6.250E-04	1.562E-04	0.11	0.9770
Error	30	0.04155	0.00139		
Total	39	0.04784			

Grand Mean 0.3970 CV 9.37

Analysis of Variance Table for Biomassa Total

Source	DF	SS	MS	F	P
Bioestimú	4	7690	1923	2.48	0.0653
Salinidade	1	192833	192833	248.52	0.0000
Bioestimú*Salinidade	4	4020	1005	1.30	0.2941
Error	30	23278	776		
Total	39	227822			

Grand Mean 483.44 CV 5.76

Analysis of Variance Table for Peso Rebentos

Source	DF	SS	MS	F	P
Bioestimú	4	1006.3	251.6	0.48	0.7511
Salinidade	1	30596.9	30596.9	58.21	0.0000
Bioestimú*Salinidade	4	1028.1	257.0	0.49	0.7438
Error	30	15769.5	525.7		
Total	39	48400.8			

Grand Mean 192.48 CV 11.91

Analysis of Variance Table for Peso Rebentos Individual Acumulado

Source	DF	SS	MS	F	P
Bioestimú	4	1796	449	2.14	0.0752
NoColheit	13	1315217	101171	482.05	0.0000
Salinidade	1	136091	136091	648.44	0.0000
Bioestimú*NoColheit	52	3771	73	0.35	1.0000
Bioestimú*Salinidade	4	5069	1267	6.04	0.0001
NoColheit*Salinidade	13	29375	2260	10.77	0.0000
Bioestimú*NoColheit*Salinidade	52	1816	35	0.17	1.0000
Error	420	88147	210		
Total	559	1581282			

Grand Mean 108.31 CV 13.38

Analysis of Variance Table for Peso Rebentos Individual

Source	DF	SS	MS	F	P
Bioestimu	4	72	17.97	0.26	0.9017
NoColheit	13	55604	4277.22	62.57	0.0000
Salinidade	1	2185	2185.50	31.97	0.0000
Bioestimu*NoColheit	52	4487	86.29	1.26	0.1137
Bioestimu*Salinidade	4	73	18.36	0.27	0.8981
NoColheit*Salinidade	13	6448	495.98	7.26	0.0000
Bioestimu*NoColheit*Salinidade	52	3030	58.27	0.85	0.7569
Error	420	28709	68.35		
Total	559	100608			

Grand Mean 13.748 CV 60.14

Analysis of Variance Table for Somatorio Peso Rebentos

Source	DF	SS	MS	F	P
Bioestimu	4	1006.3	251.6	0.48	0.7511
Salinidade	1	30596.9	30596.9	58.21	0.0000
Bioestimu*Salinidade	4	1028.1	257.0	0.49	0.7438
Error	30	15769.5	525.7		
Total	39	48400.8			

Grand Mean 192.48 CV 11.91

Analysis of Variance Table for Altura Das Plantas

Source	DF	SS	MS	F	P
Bioestimu	4	17.775	4.444	1.12	0.3670
Salinidade	1	504.100	504.100	126.68	0.0000
Bioestimu*Salinidade	4	10.650	2.662	0.67	0.6185
Error	30	119.375	3.979		
Total	39	651.900			

Grand Mean 37.050 CV 5.38

Analysis of Variance Table for Conteúdo Em Água Dos Tecidos

Source	DF	SS	MS	F	P
Bioestimu	4	9.755	2.439	2.59	0.0567
Salinidade	1	265.328	265.328	281.70	0.0000
Bioestimu*Salinidade	4	2.275	0.569	0.60	0.6629
Error	30	28.256	0.942		
Total	39	305.614			

Grand Mean 80.091 CV 1.21

Analysis of Variance Table for Diametro Do Tronco

Source	DF	SS	MS	F	P
Bioestimu	4	2.954	0.739	0.81	0.5234
Data	1	615.773	615.773	675.68	0.0000
Salinidade	1	304.863	304.863	334.52	0.0000
Bioestimu*Data	4	4.671	1.168	1.28	0.2874
Bioestimu*Salinidade	4	3.271	0.818	0.90	0.4713
Data*Salinidade	1	3.085	3.085	3.39	0.0707
Bioestimu*Data*Salinidade	4	1.564	0.391	0.43	0.7870
Error	60	54.681	0.911		
Total	79	990.862			

Grand Mean 13.712 CV 6.96

Analysis of Variance Table for Número De Folhas

Source	DF	SS	MS	F	P
Bioestimú	4	0.883	0.2208	0.78	0.5415
Salinidad	1	9.633	9.6333	34.00	0.0000
Semana	2	170.600	85.3000	301.06	0.0000
Bioestimú*Salinidad	4	1.117	0.2792	0.99	0.4197
Bioestimú*Semana	8	0.817	0.1021	0.36	0.9386
Salinidad*Semana	2	2.867	1.4333	5.06	0.0083
Bioestimú*Salinidad*Semana	8	1.383	0.1729	0.61	0.7671
Error	90	25.500	0.2833		
Total	119	212.800			

Grand Mean 8.4000 CV 6.34

Analysis of Variance Table for Percentagem Matéria Seca

Source	DF	SS	MS	F	P
Bioestimú	4	9.755	2.439	2.59	0.0567
Salinidad	1	265.328	265.328	281.70	0.0000
Bioestimú*Salinidad	4	2.275	0.569	0.60	0.6629
Error	30	28.256	0.942		
Total	39	305.614			

Grand Mean 19.909 CV 4.87

Analysis of Variance Table for Peso Fresco

Source	DF	SS	MS	F	P
Bioestimú	4	6572.3	1643.1	3.18	0.0272
Salinidad	1	69806.0	69806.0	135.17	0.0000
Bioestimú*Salinidad	4	1089.5	272.4	0.53	0.7164
Error	30	15492.5	516.4		
Total	39	92960.3			

Grand Mean 290.96 CV 7.81

Analysis of Variance Table for Peso Seco

Source	DF	SS	MS	F	P
Bioestimú	4	41.8	10.4	0.36	0.8326
Salinidad	1	10017.2	10017.2	348.80	0.0000
Bioestimú*Salinidad	4	91.5	22.9	0.80	0.5370
Error	30	861.6	28.7		
Total	39	11012.0			

Grand Mean 58.935 CV 9.09

Analysis of Variance Table for Razao Peso Fresco Peso Seco

Source	DF	SS	MS	F	P
Bioestimú	4	0.6790	0.1697	3.39	0.0211
Salinidad	1	16.7703	16.7703	334.85	0.0000
Bioestimú*Salinidad	4	0.1660	0.0415	0.83	0.5175
Error	30	1.5025	0.0501		
Total	39	19.1178			

Grand Mean 5.1175 CV 4.37

Analysis of Variance Table for FV FM

Source	DF	SS	MS	F	P
Bioestimú	4	0.00074	1.847E-04	1.47	0.2177
Salinidad	1	0.00067	6.674E-04	5.29	0.0233
Bioestimú*Salinidad	4	0.00011	2.839E-05	0.23	0.9238
Error	110	0.01387	1.260E-04		
Total	119	0.01538			

Grand Mean 0.8336 CV 1.35

Analysis of Variance Table for Valor Performance Index

Source	DF	SS	MS	F	P
Bioestimú	4	2.558	0.640	0.92	0.4538
Data	1	513.398	513.398	737.51	0.0000
Salinidad	1	78.894	78.894	113.33	0.0000
Bioestimú*Data	4	5.198	1.300	1.87	0.1173
Bioestimú*Salinidad	4	1.736	0.434	0.62	0.6462
Data*Salinidad	1	1.311	1.311	1.88	0.1714
Bioestimú*Data*Salinidad	4	0.730	0.182	0.26	0.9020
Error	220	153.147	0.696		
Total	239	756.972			

Grand Mean 2.7745 CV 30.07

Analysis of Variance Table for PRI

Source	DF	SS	MS	F	P
Bioestimú	4	0.00067	0.00017	1.81	0.1298
Salinidad	1	0.00062	0.00062	6.68	0.0107
Semana	4	0.05409	0.01352	146.57	0.0000
Bioestimú*Salinidad	4	0.00048	0.00012	1.31	0.2694
Bioestimú*Semana	16	0.00364	0.00023	2.47	0.0023
Salinidad*Semana	4	0.00548	0.00137	14.85	0.0000
Bioestimú*Salinidad*Semana	16	0.00291	0.00018	1.97	0.0184
Error	150	0.01384	0.00009		
Total	199	0.08173			

Grand Mean 0.0430 CV 22.35

Analysis of Variance Table for SPAD Folha Expandida

Source	DF	SS	MS	F	P
Bioestimú	4	136.2	34.06	1.41	0.2320
Salinidad	1	1648.2	1648.23	68.07	0.0000
Semana	8	22225.1	2778.14	114.74	0.0000
Bioestimú*Salinidad	4	22.7	5.67	0.23	0.9189
Bioestimú*Semana	32	805.8	25.18	1.04	0.4136
Salinidad*Semana	8	1809.9	226.24	9.34	0.0000
Bioestimú*Salinidad*Semana	32	910.4	28.45	1.17	0.2449
Error	270	6537.4	24.21		
Total	359	34095.7			

Grand Mean 60.512 CV 8.13

Analysis of Variance Table for SPAD Folhas Jovens

Source	DF	SS	MS	F	P
Bioestimú	4	17.87	4.468	0.13	0.9724
Salinidad	1	65.66	65.664	1.87	0.1743
Semana	3	1372.28	457.426	13.01	0.0000
Bioestimú*Salinidad	4	117.05	29.264	0.83	0.5072
Bioestimú*Semana	12	165.14	13.762	0.39	0.9644
Salinidad*Semana	3	265.16	88.386	2.51	0.0617
Bioestimú*Salinidad*Semana	12	229.40	19.117	0.54	0.8820
Error	120	4219.23	35.160		
Total	159	6451.80			

Grand Mean 49.069 CV 12.08

Analysis of Variance Table for SPAD Folha Velha

Source	DF	SS	MS	F	P
Bioestimú	4	332.98	83.24	3.08	0.0232
Salinidad	1	1274.11	1274.11	47.08	0.0000
Semana	1	671.83	671.83	24.82	0.0000
Bioestimú*Salinidad	4	293.30	73.33	2.71	0.0391
Bioestimú*Semana	4	105.58	26.40	0.98	0.4284
Salinidad*Semana	1	251.03	251.03	9.28	0.0035
Bioestimú*Salinidad*Semana	4	98.73	24.68	0.91	0.4634
Error	56	1515.57	27.06		
Total	75				

Grand Mean 49.069 CV 10.60

Analysis of Variance Table for Peso Rebentos CAMPO Individual

Source	DF	SS	MS	F	P
Bioestimú	3	1362.7	454.2	1.24	0.3008
Data	5	54949.2	10989.8	30.06	0.0000
Bioestimú*Data	15	5451.3	363.4	0.99	0.4709
Error	72	26326.9	365.7		
Total	95	88090.2			

Grand Mean 60.117 CV 31.81

Analysis of Variance Table for Peso Rebentos CAMPO Somatorio

Source	DF	SS	MS	F	P
Bioestimú	3	8176.1	2725.37	0.89	0.4730
Error	12	36644.7	3053.72		
Total	15	44820.8			

Grand Mean 360.70 CV 15.32

Analysis of Variance Table for Peso Rebentos Individual CAMPO Acumulado

Source	DF	SS	MS	F	P
Bioestimú	3	9583	3194	2.07	0.1112
Data	5	1239168	247834	160.91	0.0000
Bioestimú*Data	15	9778	652	0.42	0.9674
Error	72	110893	1540		
Total	95	1369423			

Grand Mean 212.64 CV 18.46

Analysis of Variance Table for Condutividade Eletrica Do Solo

Source	DF	SS	MS	F	P
Bioestimú	4	175795	43949	2.42	0.0703
Salinidad	1	1888537	1888537	103.94	0.0000
Bioestimú*Salinidad	4	40450	10112	0.56	0.6958
Error	30	545067	18169		
Total	39	2649849			

Grand Mean 335.69 CV 40.15

Analysis of Variance Table for pH Do Solo

Source	DF	SS	MS	F	P
Bioestimú	4	0.03921	0.00980	0.83	0.5163
Salinidad	1	0.99540	0.99540	84.35	0.0000
Bioestimú*Salinidad	4	0.11906	0.02977	2.52	0.0617
Error	30	0.35403	0.01180		
Total	39	1.50770			

Grand Mean 7.3777 CV 1.47